



ETUDE DE LA PLASTICITE DES REPONSES ADAPTATIVES PAR UNE APPROCHE DE MODELISATION MULTICRITERE CHEZ LA TRUITE ARC-ENCIEL

Bastien Sadoul

► To cite this version:

Bastien Sadoul. ETUDE DE LA PLASTICITE DES REPONSES ADAPTATIVES PAR UNE APPROCHE DE MODELISATION MULTICRITERE CHEZ LA TRUITE ARC-ENCIEL. Sciences du Vivant [q-bio]. Agrocampus Ouest, 2014. Français. NNT: . tel-01227703

HAL Id: tel-01227703

<https://theses.hal.science/tel-01227703>

Submitted on 12 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° ordre : 2014-32

N° Série : B-260

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne

pour obtenir le diplôme de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES,
AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE**

Spécialité : Biologie et Agronomie

Ecole Doctorale : Vie Agro Santé

présentée par :

SADOUL BASTIEN

**ETUDE DE LA PLASTICITE DES REPONSES ADAPTATIVES PAR UNE
APPROCHE DE MODELISATION MULTICRITERE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-
CIEL**

soutenue le 15 Décembre 2014 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Fabienne Blanc, Professeure, VetAgro Sup / Rapporteur

Jose-Luis Zambonino, Directeur de Recherche, IFREMER / Rapporteur

Lucile Montagne, Professeure, Agrocampus Ouest / Examineur

David McKenzie, Directeur de Recherche CNRS / Examineur

Nicolas C. Friggens, Directeur de Recherche, INRA AgroParisTech / Co-Directeur de thèse

Patrick Prunet, Directeur de Recherche, INRA / Directeur de thèse

Sommaire

Préambule.....	1
INTRODUCTION GENERALE	5
1 L'animal face à la variation de son environnement	6
1.1 L'animal dans un milieu stable.....	6
1.2 Notion de robustesse.....	7
1.3 La capacité adaptative, mécanisme de la robustesse	8
1.4 Le degré de perturbation.....	11
1.5 L'animal en situation d'élevage	12
2 La modélisation pour approcher le concept de robustesse.....	14
2.1 Le modèle conceptuel	14
2.2 Caractériser des cinétiques de réponses.....	16
2.3 Comparer des réactions de natures différentes	16
2.4 La base d'un modèle plus complexe.....	17
2.5 Utilisation de la truite arc-en-ciel comme modèle d'étude.....	17
3 La truite arc-en-ciel face à la variation de son environnement	18
3.1 Les variations de qualité d'eau	18
3.2 Les perturbations environnementales liées aux pratiques d'élevage.....	21
3.3 Les réponses face à une perturbation.....	22
3.4 Les lignées isogéniques	26
4 Objectifs de l'étude	28
CHAPITRE 1 Mise en place des outils de suivi en continu des mécanismes adaptatifs.....	31
1 Développement d'un outil de suivi en continu du comportement en groupe des poissons.....	32
2 Les bacs expérimentaux et la distribution d'eau	61
3 Mesures du cortisol dans l'eau et de la consommation en oxygène	61
3.1 Cortisol dans l'eau	62
3.2 Consommation en oxygène	62
4 Mesures invasives : concentration de cortisol et contenu en eau dans l'individu entier.....	63

CHAPITRE 2	Etude de la variabilité des réponses adaptatives dans une expérience de confinement.....	65
CHAPITRE 3	Etude de la variabilité des réponses adaptatives dans une expérience d'hypercapnie.....	93
CHAPITRE 4	Modèle pour la description des réponses adaptatives d'un système lors d'une perturbation aiguë.....	113
DISCUSSION	133
1	Aborder la robustesse en décrivant les mécanismes sous-jacents.....	135
1.1	La théorie de l'allocation de ressources et la notion de trade-off.....	135
1.2	Risques de la résistance à tout prix.....	136
1.3	L'idéal : réagir avec modération ?.....	137
2	Les lignées isogéniques, variabilités, apports et interrogations.....	138
2.1	Des histoires de vie différentes.....	139
2.2	Les niveaux d'action des différences d'histoire de vie.....	140
2.3	Ce que traduit une forte variabilité du degré de perturbation.....	142
3	Approche de modélisation, limites et perspectives.....	143
3.1	Perfectionnement du modèle.....	144
3.2	Perspectives.....	147
BIBLIOGRAPHIE GENERALE	151
ANNEXES	174
	Annexes de l'article 1.....	174
ABSTRACT	176
RESUME	177

Liste des figures

Figure 1. Deux niveaux de contrôle des variations environnementales en système d'élevage afin d'obtenir des fonctions stables au cours du temps.	2
Figure 2. Exemples de solutions proposées pour contrôler les conditions d'élevage ou la santé animale.	3
Figure 3. Un système dans un environnement stable.	7
Figure 4. Le système non robuste (ou vulnérable) lors d'une perturbation de son environnement.	8
Figure 5. Deux réponses adaptatives différentes pour une même perturbation.	9
Figure 6. Un système résistant est capable de conserver sa fonction sans faire varier ses sous-systèmes.	10
Figure 7. La sélection sur un phénotype donné diminue la stabilité du système.	12
Figure 8. Approche hiérarchique pour décrire la robustesse.	15
Figure 9. Variations sur 24 heures de la concentration en dioxygène dans un bassin d'eau recirculée de la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée.	20
Figure 10. Variations de la température de l'eau entrante à la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée au cours de l'année 2012.	20
Figure 11. Exemple de variation de la densité durant les 150 premiers jours de l'élevage d'une lignée isogénique de truites arc-en-ciel à la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée.	21
Figure 12. Représentation schématique des axes de réponses du système neuroendocrinien à une perturbation environnementale.	23
Figure 13. Poids avant et après un challenge de 25 jours avec 100% d'aliment végétal sur deux lignées de truite arc-en-ciel (A et R).	28
Figure 14. Calculation of group behaviour index from images extracted from a video taken from the top of a tank.	39
Figure 15. Comparison of the dispersion index (P_{tot}) and the distance between individuals in a group behaviour simulation, where the cohesion of the group varies.	46
Figure 16. Comparison of the swimming activity index (A_{diff}) and the mean of the swimming speed of each individual in a group behaviour simulation, where swimming speed limit of individuals varies.	47

Figure 17. Comparison of Israeli's index SDX and the distance between individuals in a group behaviour simulation, where the cohesion of the group varies.....	48
Figure 18. Comparison of three indexes translating fish group dispersion: P_{tot} , SDX and SDY in 4 images.	49
Figure 19. Mean and standard error of group dispersion (P_{tot}) (A) and of group swimming activity (A_{diff}) (B) over time, before and after food distribution (vertical line at 300 s) in 8 aquaria.....	51
Figure 20. Mean and standard error of group dispersion (P_{tot}) (A) and of group swimming activity (A_{diff}) (B) over time, before and after a confinement (shaded rectangle) in 4 aquaria. Confinement consisted in placing all fish in a landing net inside the aquarium for 4 hours.....	51
Figure 21. Patron d'un bac expérimental. Réalisé avec des plaques de PVC beige.	61
Figure 22. Augmentation de la concentration d'oxygène dans l'eau des bacs expérimentaux.	63
Figure 23. Design of the confinement experiment during time.	73
Figure 24. Impact of a confinement challenge on repeated measures of physiological and behavioural measures in two isogenic lines (A and R) of rainbow trout.....	78
Figure 25. Impact of a confinement challenge on whole body cortisol concentrations and water content in two isogenic lines (A and R) of rainbow trout.....	79
Figure 26. Principal component analysis of variability in physiological and behavioral amplitudes and recoveries in a confinement experiment for two isogenic lines of rainbow trout (A and R).....	81
Figure 27. Number of aggressions per minute before the confinement stress in lines A and R.....	82
Figure 28. Correlation between cortisol release rate amplitude in a confinement experiment and the number of aggressions per minute before the confinement challenge for two isogenic lines (A and R).....	82
Figure 29. Design of the hypercapnia experiment over time.	98
Figure 30. CO ₂ concentration in the supplied water (full line) and in the test aquarium (points) during the two replicates of a hypercapnia experiment (shaded rectangle).....	99
Figure 31. pH in the test aquarium during the two replicates of a hypercapnia experiment (shaded rectangle).	99
Figure 32. Impact of a hypercapnia challenge on repeated measures of physiological and behavioural measures in two isogenic lines (A and R) of rainbow trout.....	103

Figure 33. Principal Component Analysis (PCA) of variability in physiological and behavioral amplitudes and recoveries in a hypercapnia experiment for two isogenic lines of rainbow trout (A and R).....	105
Figure 34. Number of aggressions per minute before the hypercapnia stress in lines A and R.	106
Figure 35. The Kelvin-Voigt model in a non-perturbed environment (1.a) and during a perturbation (1.b).	117
Figure 36. An example of the outcomes of the model and its extrapolated features when continuously and constantly perturbed between τ_1 and τ_2	118
Figure 37. Design of the confinement experiment during time.	119
Figure 38. Analysis sensitivity of the model where the parameter K varies and a continuous perturbation occurs between 20 and 60.	123
Figure 39. Analysis sensitivity of the model where the parameter C varies and a continuous perturbation occurs between 20 and 60.	123
Figure 40. Analysis sensitivity of the model where the parameter F_{pert} varies and a continuous perturbation occurs between 20 and 60.....	123
Figure 41. Fitting the model to cortisol release rate, oxygen consumption, group activity and group dispersion during in rainbow trouts facing and recovering from a confinement challenge (grey rectangle).....	124
Figure 42. Les réponses adaptatives d'un individu robuste doivent être dépendantes de la durée et de la force de la perturbation.....	139
Figure 43. Effet des stades d'élevage avant l'expérience sur le champ des phénotypes possible (variances de bleu) pour une lignée isogénique.	140
Figure 44. Approche hiérarchique pour décrire la robustesse incluant la perception et les niveaux d'action de l'histoire de vie.	141
Figure 45. Une lignée présentant une forte variabilité des degrés de perturbation (gauche) et une lignée présentant peu de variations des degrés de perturbation (droite).	143
Figure 46. Proposition de la décroissance dans le temps de la perception durant une perturbation (carré rouge)	145
Figure 47. Différence de réponse à une perturbation entre un système dont la perception reste constante durant la perturbation (gauche) et un système dont la perception varie (droite).	145

Figure 48. Exemples de sorties de modèle pour des réponses à une perturbation (période rouge) lorsque la perturbation est répétée n fois d'affilé chez deux systèmes présentant des capacités d'habituations différentes.	147
Figure 49. Lissages différentiels d'une courbe de rendement laitier permettant d'extraire les périodes de perturbation.....	149

Liste des tableaux

Tableau 1. Ordre de grandeur de la tolérance de la truite arc-en-ciel pour 4 paramètres de la qualité d'eau.....	19
Tableau 2. Différences comportementales et physiologiques relatives entre les individus proactifs et réactifs.....	26
Table 3. Factors significativity results from linear models estimating effects of aquarium and time periods on the two behavioural indexes P_{tot} and A_{diff} in two case studies.	50
Table 4. Comparison of the 20 time points of the temporal pattern for the two behavioural indexes (P_{tot} and A_{diff}) in the two case studies.	52
Table 5. Correlation between amplitude and recovery of physiological and behavioral responses to a confinement for each measure.....	81
Table 6. Significant differences between the time points (in hours) in the behavioral temporal pattern (figure 4) compared to the mean of the pre-challenge time points.....	103
Table 7. Adjusted (K and C) and calculated (T and x_{inf}) parameters from the model, for two isogenic lines subjected to a confinement challenge.	125
Table 8. Pearson's correlation coefficients table between adjusted parameters.	125
Tableau 9. Résumé des principaux résultats des expériences de confinement et d'hypercapnie sur les lignées isogéniques A et R de truite arc-en-ciel.	134

Remerciements

Je souhaite, tout d'abord, remercier Patrick Prunet, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet. Je tiens également à saluer sa curiosité pour de nouveaux domaines de recherche et son dynamisme dans la création de projets. J'espère avoir appris de ces qualités et de cet enthousiasme.

Un grand merci également à Nicolas C. Friggens, mon co-directeur de thèse, pour toutes ces discussions qui ont considérablement fait avancer le projet d'un point de vue purement conceptuel mais également statistique. Nicolas a toujours été disponible lorsque le projet commençait à « coincer », apportant constamment une dimension positive au travail, encourageante et valorisante. Je remercie également Violaine Colson et Isabelle Leguen, mes deux encadrantes de thèse, qui m'ont toujours, chacune dans leur spécialité, apporté leurs conseils avisés et leur aide technique lorsque demandés.

Plus globalement, je suis très reconnaissant envers l'ensemble de l'équipe encadrante pour m'avoir fait autant confiance à travers une forte liberté de travail et de nombreuses implications dans de nouveaux projets, groupes de travail et laissé prendre part à de nombreux congrès. Je pense que cet état d'esprit m'a été très bénéfique et m'a énormément apporté sur le plan professionnel et personnel. Dans ce cadre, je souhaite aussi remercier mon comité de thèse composé de Mathilde Dupont-Nivet, Angélique Favreau, Christèle Robert-Granié et Georges Baffet pour leurs encouragements et leurs bons conseils. Enfin, un grand merci au jury de thèse pour son intérêt et ses commentaires.

Il me semble également indispensable de remercier l'importante aide technique obtenue durant ces 3 années. Je pense plus particulièrement à Claudiane Valotaire et Frédéric Borel pour leur aide continue dans la réflexion et la conception des outils ayant permis le bon déroulement des expériences réalisées durant cette thèse. Un grand merci également à tout ceux sans lesquels ces expériences n'auraient pas pu avoir lieu et qui m'ont tous apporté de près ou de loin leur aide ; Laurent Labbé, Lionel Goardon, Jean-Michel LeCalvez, Jean-Luc Thomas, Cécile Duret, Amélie Patinote. Je remercie ainsi également le laboratoire LPGP pour son accueil et plus particulièrement les non-titulaires sans qui l'ambiance ne serait pas pareille!

Ces remerciements seraient très incomplets si j'oubliais les ami(e)s qui m'ont soutenu et divertit avant, pendant et, j'en suis persuadé, après cette thèse. Un grand merci aux deux

autres capitaines de MerCalme, Felix et Benoit, aux autres rennais ou assimilés Adri, Anne-Cha, Valoch et Goulven, Laurence, Mazoche et Touftouf, Benjamin et Soizic, aux ex-collègues devenus amis, Benjamin, Clo et Fred, Lily et Kéké, Fred, Phuong et Nic, aux ex-Nancéens, les Mamours, les Minous, Cam, Quentin, Mimine, Max 1, Max 2, Bouly, et aux ex-Grenoblois, Flo et Guigui.

Comme d'habitude, le meilleur pour la fin, un énorme merci à la Famille et plus particulièrement mes Parents et ma Soeur d'être présents tout simplement.

Enfin, le plus gros et le plus beau des mercis revient à Marion qui m'a accompagné tout au long de ces 3 années et qui m'accompagnera, je l'espère, encore longtemps.

Merci à tous!

Préambule

Que ce soit en milieu naturel ou en élevage, les animaux doivent faire face à des perturbations de leur environnement. En raison d'un nombre croissant d'évènements météorologiques extrêmes et imprévisibles (Hansen et al., 2012), il est indispensable que les animaux soient capables de mettre en place des mécanismes permettant de s'adapter et de survivre. Parallèlement, malgré le contrôle des conditions d'élevage, les animaux de rente sont soumis à de multiples perturbations liées aux systèmes de production ou aux variations de leur milieu. Ces perturbations peuvent être à l'origine d'une diminution de la production, d'une augmentation de la fragilité des animaux, et d'une dégradation de leur bien-être et de leur état de santé.

En production animale, deux principaux niveaux de contrôle des variations environnementales existent (Figure 1) (Napel et al., 2006). Le premier fait intervenir les pratiques d'élevage qui permettent de lisser la courbe environnementale en contrôlant les conditions climatiques (ex : température, oxygène) et en gérant les maladies (ex : vaccins, antibiotiques, abattage précoce). Le deuxième niveau de contrôle fait intervenir la robustesse intrinsèque des animaux d'élevage. Les animaux robustes sont, en effet, capables de conserver, malgré les variations de l'environnement leurs fonctions de production (Ellen et al., 2009a; Knap, 2005; Strandberg et al., 2009). Dans un contexte où les variations environnementales des animaux de rente augmentent, il est possible de favoriser tel ou tel niveau de contrôle pour permettre au système d'élevage de continuer à fonctionner normalement. Ainsi, de nombreuses solutions permettant d'améliorer le premier niveau de contrôle sont proposées (Figure 2). Ces solutions bien qu'efficaces et rapides à mettre en œuvre, sont généralement coûteuses et énergivores et ne vont donc pas dans le sens des recommandations de durabilité des élevages (voir p. 12). Les autres solutions consistent principalement à améliorer le deuxième niveau de contrôle en favorisant la robustesse des animaux de rente. Actuellement, il est envisagé d'améliorer la robustesse des animaux à l'aide d'outils classiques de sélection ou à l'aide d'évènements précoces capables de favoriser la robustesse (Napel et al., 2009). Cependant, la caractérisation de la robustesse n'est pas encore maîtrisée et les importances relatives de ses composantes génétiques et environnementales ne sont pas encore connues. Ainsi afin d'assurer une gestion durable des systèmes d'élevage, il semble indispensable d'aider à la caractérisation de la robustesse des animaux face à des perturbations environnementales.

Le travail présenté dans cette thèse vise à avancer dans cette problématique en décrivant les capacités des animaux à faire face à une perturbation environnementale. Il est maintenant globalement admis que les réponses d'un animal aux perturbations doivent s'étudier dans le temps en analysant l'amplitude des réponses mais également la capacité à récupérer de la perturbation (Blanc et al., 2010; Sauvart and Martin, 2010). Ces réponses sont nombreuses et de natures variées, l'ensemble formant un réseau complexe décrivant la capacité de l'animal à faire face. Etudier les réponses aux perturbations nécessite donc d'être capable de (1) décrire de façon non-invasive les réponses au cours du temps, (2) d'extraire les caractéristiques d'intérêt de ces cinétiques de réponses et (3) d'être capable d'intégrer ces caractéristiques au sein d'analyses multivariées.

Le travail présenté ici s'est intéressé à apporter des éléments de réponse à chacun de ces points en se focalisant sur un modèle animal d'intérêt aquacole : la truite arc-en-ciel, le poisson le plus produit en France mais également un modèle représentatif des salmonidés d'élevage. Les points (2) et (3) développés dans la suite du manuscrit ont pour but d'être suffisamment génériques pour s'appliquer à tout type de système biologique soumis à une perturbation.

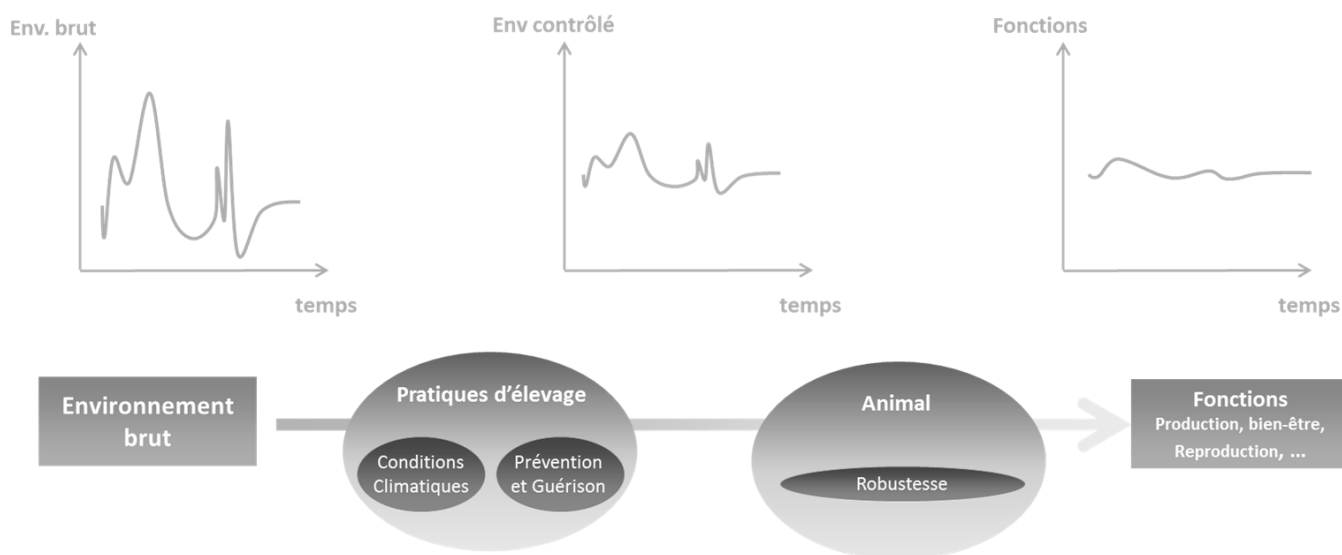



Figure 1. Deux niveaux de contrôle des variations environnementales en système d'élevage afin d'obtenir des fonctions stables au cours du temps.


Un environnement brut est lissé grâce aux pratiques d'élevage puis grâce à la robustesse de l'animal.

Contrôle de l'environnement




Earmy – L'échangeur de température innovant de Big Dutchman - diminue les coûts de chauffage de 35 à 60 %, améliore l'ambiance du bâtiment et réduit les émissions : 30% moins d'ammoniac, de poussières et d'odeurs par an ! Veuillez aussi consulter les conclusions du test DLG. (775.2 KB)

[Download](#)




Ventilation CombiTunnel - Un système intelligent pour le contrôle de climat de votre poulailler qui associe deux systèmes de ventilation pour garantir la stabilité du contrôle de climat et des conditions ambiantes idéales pour les animaux. Cette solution est recommandée dans les cas de fortes variations de température.

[Download](#)




235pro - L'ordinateur de gestion optimal dans les poulaillers pour la climatisation facile à installer et à fonctionner sûr et fiable dans votre bâtiment d'élevage ou de production. Le système d'ouverture automatique de la température permet de contrôler la température en cas de coupure de courant.

[Download](#)




Systèmes d'admission - une alimentation en air qui répond aux exigences requises (pression positive ou négative) propose une large gamme d'air: entrée d'air au sol, d'aération FAC ou Full FAC. Plus amples informations sur cette brochure! (2.3 MB)

[Download](#)




Ventilateurs muraux - performant et d'une longue durée de vie, se distinguant avant tout par leur puissance, leur faibles besoins en énergie, leur robustesse ainsi que leur résistance à la corrosion. Big Dutchman offre une grande diversité de types. (1.2 MB)


[Download](#)




Herd Health Programs




Lung Health




Neonatal Health




Parasite Control




Partners In Reproduction



Performance Technology



Sheep Health



Udder Health

Figure 2. Exemples de solutions proposées pour contrôler les conditions d'élevage ou la santé animale.

(extraits des sites internet : www.bigdutchman.de et www.merck-animal-health.com)

INTRODUCTION

GENERALE

1 L'animal face à la variation de son environnement

La longue histoire évolutive a façonné le génotype des organismes vivants, leur permettant d'exprimer un phénotype conçu pour survivre, se reproduire et se développer dans un environnement donné. Cependant, cet environnement varie dans le temps ou dans l'espace avec des intensités plus ou moins importantes. Afin de faire face à ces variations environnementales, le phénotype n'est pas figé dans le temps. Ainsi, l'organisme peut être qualifié de plastique, résistant ou être décrit comme un organisme robuste ou présentant de bonnes capacités d'adaptation. Il s'agit là de termes controversés qu'il est important de définir et d'illustrer. Ces termes sont abondamment utilisés à tous les niveaux d'organisation de la biosphère, allant de la cellule à l'écosystème (Kitano, 2004; Mumby et al., 2014). Chaque auteur a proposé sa propre définition, favorisant la complexité au dépend de la simplicité. L'objectif de cette partie est de faire paraître comme évidents des termes pouvant être aisément confondus à la lecture des nombreuses définitions les caractérisant.

“Simple isn't the same as obvious” Staddon (Staddon, 2001)

1.1 L'animal dans un milieu stable

Lorsque l'environnement ne varie pas, l'animal suit sa trajectoire de vie déterminée par son génotype. Ainsi, sur des périodes de temps suffisamment courtes pour supposer que l'environnement ne varie pas, nous pouvons estimer que les variations du phénotype que l'on observe sont négligeables. La Figure 3 décrit l'animal comme un système stable dans un environnement donné. Ce système est composé de fonctions (phénotypes) d'intérêt pour la production animale ou pour le succès de colonisation d'un écosystème. A l'échelle de l'animal, il s'agit par exemple, de sa capacité à se reproduire, de sa croissance, de sa teneur en viande maigre... dont la force est représentée par la longueur du rectangle bleu. Ce phénotype d'intérêt est soutenu par des systèmes sous-jacents. Ces systèmes sont définis comme étant les processus impliqués dans le maintien d'une variable physiologique. Il peut s'agir selon Romero ((Romero et al., 2009) du métabolisme, du système endocrinien ou encore du comportement.

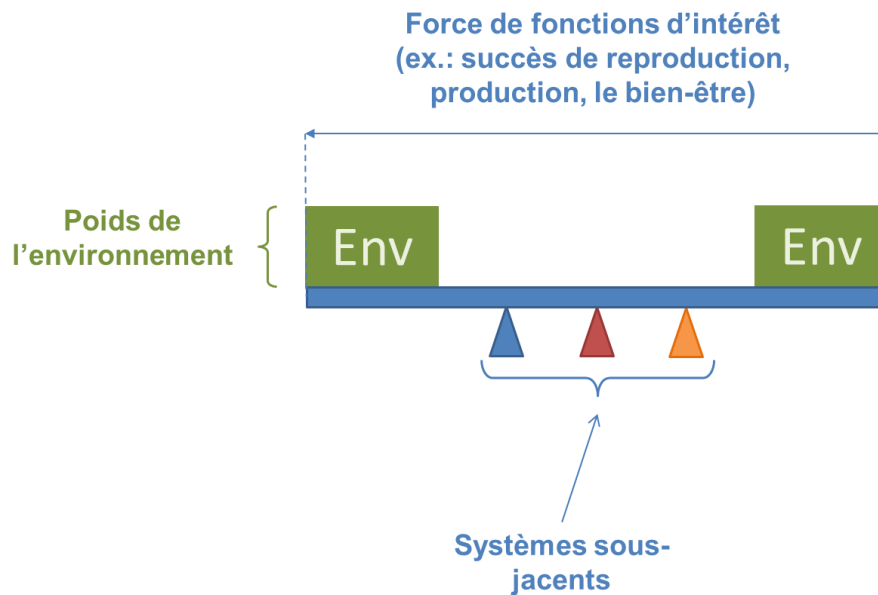


Figure 3. Un système dans un environnement stable.

Ce système est défini par la force de ses fonctions d'intérêt (longueur du rectangle bleu) et des systèmes sous-jacents soutenant ces fonctions.

1.2 Notion de robustesse

L'environnement du système n'est jamais totalement stable dans le temps. Nous appellerons les modifications environnementales, des **perturbations**. Lorsque la perturbation est menaçante pour l'équilibre du système, Selye (Selye, 1946) nomme cette modification « Stressor ». Les perturbations peuvent être classifiées suivant leur origine. Chez les animaux, il existe ainsi des perturbations physiques ou psychologiques pouvant avoir les mêmes conséquences (Von Borell, 2001). La robustesse, se définissant dans un environnement qui varie, doit prendre en compte tout type de perturbations qu'elles soient physiques ou psychologiques.

De façon générale, la **robustesse** biologique est définie par Kitano, comme la propriété permettant à un système biologique de maintenir ses fonctions malgré les perturbations de son environnement (Kitano, 2004). La robustesse est également définie comme la capacité exprimée par un génotype à garder un phénotype constant malgré les perturbations environnementales (Queitsch et al., 2012). Dans un contexte agronomique, Knap (Knap, 2005) définit une espèce robuste lorsqu'elle est capable de garder de bonnes fonctions de production malgré les perturbations.

A l'opposé du système robuste, le système vulnérable (de Goede et al., 2013), ne supporte pas la perturbation environnementale, entraînant l'effondrement du système biologique ou la diminution de la fonction d'intérêt (Figure 4).

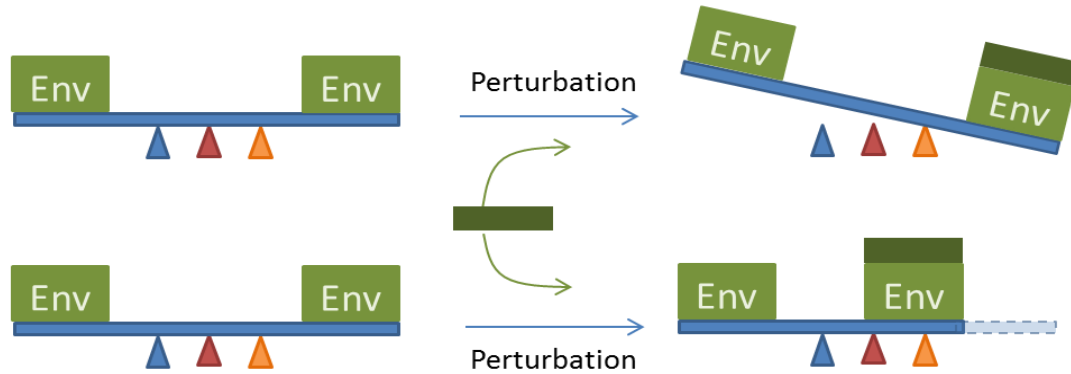


Figure 4. Le système non robuste (ou vulnérable) lors d'une perturbation de son environnement.

Lors de la perturbation, soit le système s'effondre, soit il diminue ses fonctions d'intérêt.

Ces définitions suggèrent que la robustesse est donc liée à la fonction d'intérêt et ne s'intéresse pas à l'état du système biologique; tant que cette fonction est conservée, le système est dit robuste. Suivant l'échelle d'étude, différentes caractéristiques du système biologique peuvent être considérées comme fonction d'intérêt (Blanc et al., 2013). Il peut s'agir par exemple de l'activité d'une protéine ou de l'expression d'un gène à l'échelle de la cellule (Félix and Wagner, 2006), d'un comportement alimentaire ou d'une capacité à se reproduire à l'échelle de l'animal (Lawrence et al., 2009). Un système peut donc être considéré comme robuste mais présenter d'importantes variations de son état, liées aux modifications des systèmes sous-jacents à la fonction d'intérêt. Les modifications des systèmes sous-jacents font partie de la capacité adaptative du système.

1.3 La capacité adaptative, mécanisme de la robustesse

Nous définissons la capacité adaptative comme étant la faculté d'un système à faire face aux perturbations de son environnement (Adger, 2006; Smit and Wandel, 2006). Cette capacité est la résultante des stratégies faisant intervenir les mécanismes sous-jacents des fonctions d'intérêts. Deux principales stratégies forment la capacité adaptative de l'animal et font intervenir les propriétés de plasticité ou de résistance des réponses adaptatives.

1.3.1 Plasticité des réponses adaptatives

Selye (Selye, 1976) considère que face à une perturbation nuisible, des réponses sont mises en place afin de maximiser la survie et de minimiser l'impact de la perturbation. Ces réponses forment un ensemble appelé « stress ». Nous définissons les réponses mises en place par l'animal et permettant de faire face à la perturbation comme des **réponses adaptatives**.

Ainsi, face à une perturbation environnementale, le système robuste est capable de préserver ses fonctions d'intérêt en faisant varier les systèmes sous-jacents. Plusieurs types de réponses adaptatives peuvent permettre de faire face à une même perturbation (Figure 5).

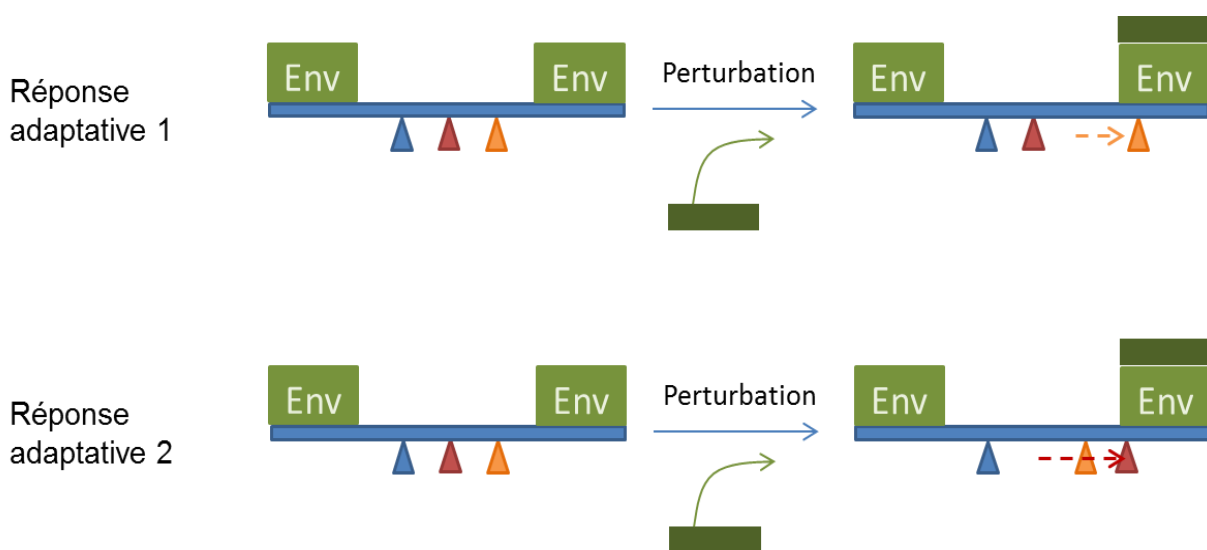


Figure 5. Deux réponses adaptatives différentes pour une même perturbation.

Les réponses adaptatives sont différentes mais permettent de garder la fonction d'intérêt malgré la perturbation de l'environnement.

Certaines expériences ont par exemple montré que le contrôle d'un environnement nuisible pouvait être réalisé par des réponses adaptatives comportementales radicalement différentes chez le rat (Koolhaas et al., 1999; Sluyter et al., 1996). Le test consiste à placer un aiguillon électrique dans la cage d'un rat et à étudier sa réponse comportementale lui permettant de faire face à la perturbation. Suite à une première décharge électrique liée à un contact, les rats montrent une défense comportementale proactive en enterrant l'aiguillon sous la litière de la cage ou, au contraire, ils montrent une défense réactive en évitant d'approcher de la zone nuisible. Dans les deux cas, les rats ont mis en place une réponse adaptative permettant de s'affranchir de la perturbation environnementale aversive.

La **plasticité des réponses adaptatives** de l'animal correspond à cette capacité à modifier ses systèmes sous-jacents pour faire face à la perturbation. Il semble important qu'un individu robuste soit capable de modifier son état (une forte plasticité adaptative) afin de pouvoir s'adapter au mieux à une perturbation environnementale. Cependant, mettre en place les mécanismes adaptatifs présente un coût énergétique fort. Il a par exemple été montré que les mécanismes d'osmorégulation permettant au poisson de s'adapter aux variations osmotiques de l'eau pouvaient représenter 20 à 68% de l'énergie totale dépensée par le poisson (Bœuf and Payan, 2001; Morgan and Iwama, 1991). De la même façon, chez les animaux homéothermes, la fièvre consistant en une modification adaptative de la température corporelle pour faire face à une infection, présente un coût métabolique important pour l'animal (Baracos et al., 1987; Nilsson, 2003). Il semble donc essentiel que le système soit capable de les mettre en place uniquement lorsque cela est nécessaire.

1.3.2 Résistance des réponses adaptatives

Selon Wingfield (Wingfield, 2013), un animal robuste doit être résistant aux perturbations et doit éviter de déclencher ses mécanismes adaptatifs. Une deuxième composante de la robustesse s'ajoute donc à la capacité adaptative, il s'agit de la résistance. La **résistance** peut être considérée comme la capacité à conserver sa fonction d'intérêt sans modifier son état, c'est-à-dire en présentant une plasticité des réponses adaptatives presque nulle (Figure 6). Ceci est possible lorsque la perturbation est considérée comme non menaçante par le système. Le caractère résistant d'un système peut sembler très attractif puisqu'aucun mécanisme adaptatif n'est nécessaire, diminuant ainsi la demande en énergie. Cependant, un système résistant est généralement capable de faire face à des perturbations environnementales faibles ou de courte durée seulement. Si celles-ci deviennent trop importantes, le système risque de s'effondrer.

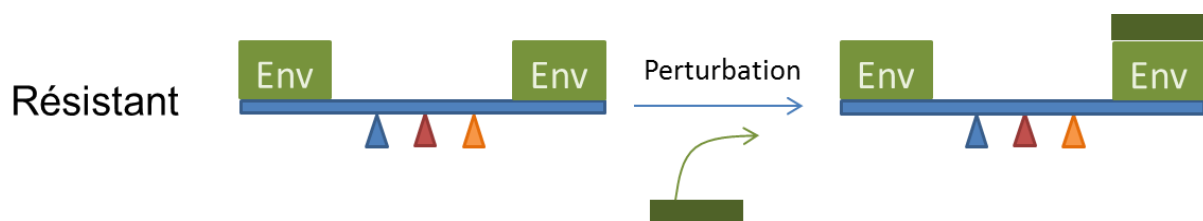


Figure 6. Un système résistant est capable de conserver sa fonction sans faire varier ses sous-systèmes.

1.3.3 Déterminismes génétique et environnemental de la capacité adaptative du système biologique

Comme toute variable phénotypique, les variations des réponses adaptatives entre systèmes biologiques peuvent être d'origine génétique, dues à des allèles différents entre les individus, et d'origine environnementale, dues à une histoire de vie et des conditions extérieures particulières. De nombreuses études ont montré l'existence d'une bonne héritabilité des capacités à faire face à une perturbation environnementale et suggèrent donc que ces paramètres sont sous contrôle génétique (Drangsholt et al., 2014; Mousseau and Roff, 1987; Storset et al., 2007). L'identification de QTL (quantitative trait loci) pour certaines réponses adaptatives ont prouvé le lien génétique direct de ces traits (Christensen et al., 2014; Norman et al., 2011; Quillet et al., 2014).

L'effet de l'environnement sur les réponses adaptatives a également été démontré. Il est par exemple maintenant connu qu'une modification environnementale au moment de l'embryogenèse peut avoir des conséquences à long terme sur certaines réponses adaptatives telles que le comportement ou la réactivité de l'axe corticotrope (Braastad, 1998; Liu et al., 1997; Szuran et al., 1991).

La capacité adaptative du système biologique est donc liée au génotype et à l'environnement du système.

1.4 Le degré de perturbation

En fonction de la capacité adaptive du système et de la force d'une perturbation environnementale, le système montre un **degré de perturbation** donné. Ce degré de perturbation s'évalue en intégrant les écarts à l'état initial, c'est-à-dire les **amplitudes de réponse** de chacun des sous-systèmes adaptatifs du système biologique. Ainsi, le système résistant va présenter, contrairement au système plastique, un degré de perturbation faible face à la perturbation. De même, une perturbation importante de l'environnement risque d'augmenter le degré de perturbation du système biologique. Le degré de perturbation est donc fonction d'une force de perturbation et d'une capacité du système à faire face.

Lorsque la perturbation est passée, le système doit être capable de retrouver rapidement un état d'équilibre. Si l'on estime que le système était dans un état optimal avant la perturbation, on espère rapidement retrouver le système à son état initial (Sauvant and Martin, 2010; Wingfield, 2013). Si ce n'est pas le cas, un nouvel état est envisageable. Nous

définissons la capacité de récupération comme étant la capacité du système à revenir à un état d'équilibre. Il est important de prendre en compte cette capacité dans les estimations du degré de perturbation de l'animal (Sauvant and Martin, 2010). En effet, le système montrant de faibles variations de ses réponses adaptatives mais une longue durée de retour à l'équilibre, doit être caractérisé par un degré de perturbation fort.

1.5 L'animal en situation d'élevage

En production animale, la sélection s'est longtemps focalisée sur l'augmentation de phénotypes d'intérêt pour la production, tels que la quantité de lait, le taux de croissance, la taille de la portée ou encore le rythme de ponte. Cette sélection a permis d'augmenter fortement l'efficacité des systèmes d'élevage (Thornton, 2010) mais elle s'est avérée entraîner des effets indésirables liés à une diminution de leur robustesse (Figure 7). Les exemples en production animale sont nombreux avec notamment une plus grande susceptibilité aux pathogènes ou une plus faible capacité à se reproduire (Rauw, 2007; Rauw et al., 1998; Sandoe et al., 1999). Une récente méta-analyse a par exemple montré que la sélection pour une croissance rapide chez les volailles a un effet négatif significatif sur leurs fonctions immunitaires (van der Most et al., 2011). Dans les situations les plus extrêmes, les animaux d'élevage ont montré des difficultés à survivre dans un environnement pourtant stable, avec comme exemple le plus connu, le poulet de chair dont les nombreux problèmes de pattes (Kestin et al., 1992) ont diminué ses capacités à marcher (Knowles et al., 2008).

En parallèle, les préoccupations sociétales vis-à-vis des systèmes d'élevage sont grandissantes. Les impacts des systèmes d'élevage sur l'environnement et l'écologie ont été largement démontrés et les problèmes de bien-être des animaux en élevage sont largement critiqués (Kanis et al., 2004; Steinfeld et al., 2006). Ainsi, dans un souci de durabilité et d'amélioration du bien-être animal, les demandes sociétales tendent à mobiliser des systèmes de production dans lesquels le milieu est moins contraint et moins contrôlé. Les espèces agronomiques devront donc faire face à des perturbations environnementales plus importantes et diversifiées.

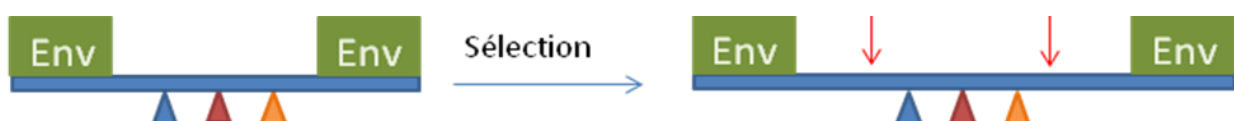


Figure 7. La sélection sur un phénotype donné diminue la stabilité du système.

Des efforts sont donc fournis depuis quelques années pour améliorer la robustesse des fonctions d'intérêt, en favorisant la capacité à maintenir les fonctions de production malgré les perturbations environnementales (Knap, 2005; Napel et al., 2006). Ainsi, un intérêt grandissant est porté à la robustesse dans son ensemble et notamment à la capacité adaptative en production animale (Dumont et al., 2014). En effet, les instances gouvernementales et professionnelles soutiennent depuis quelques années de nouveaux projets ambitieux visant à comprendre et améliorer les capacités adaptatives des animaux de production. En France, l'Agence Nationale de Recherche a par exemple lancé en 2011, 2012 et 2013 le programme BioADAPT (ANR, 2013) visant à soutenir des projets s'intéressant à la capacité adaptative des productions afin de « prendre en compte de manière prioritaire les capacités d'adaptation des organismes vivants aux stress et aux perturbations de tout ordre associées aux changements globaux ». Au niveau Européen, la plateforme technologique FABRE (2011) estime que l'animal de production du futur devra être « robuste, adapté et sain ». De même concernant l'aquaculture, la plateforme écrit que « l'industrie a besoin d'animaux en bonnes conditions physiques et robustes à des paramètres environnementaux variables ».

L'émergence de cette problématique dans les domaines de la recherche scientifique et de la production animale est une conséquence des nouvelles demandes sociétales visant à diminuer les impacts des pratiques d'élevage sur l'environnement, sur les qualités des produits ou sur le bien-être animal. L'amélioration de la robustesse des animaux de rente, capables de faire face à des environnements fluctuants, doit permettre de diminuer les risques sanitaires, permettant de réduire les intrants tels que les antibiotiques ou les vitamines, de diminuer les coûts énergétiques liés aux contrôles de l'environnement des installations, et de diminuer le stress des animaux de rente et donc améliorer leur bien-être. Ainsi, pour certains auteurs, l'amélioration de la robustesse permettrait d'apporter une réponse aux problèmes majeurs en élevage :

“More robust cattle have the potential to increase farm profitability, improve animal welfare, reduce the contribution of ruminant livestock to greenhouse gas emissions and decrease the risk of food shortages in the face of increased variability in the farm environment.” (Amer, 2012).

Cependant, les défis scientifiques restent importants puisqu'aucune méthode efficace de phénotypage permettant de décrire la robustesse n'a encore été développée (Dumont et al., 2014). Les priorités de recherche sur la robustesse s'orientent donc vers :

- le développement de méthodes non-invasives et fiables permettant d'obtenir des données phénotypiques sur la robustesse des animaux.
- la mise en place d'un cadre statistique permettant d'analyser ces données et d'estimer et de modéliser les interactions génotype x environnement pour la robustesse.

2 La modélisation pour approcher le concept de robustesse

2.1 Le modèle conceptuel

Aucune mesure directe de la robustesse générale des individus n'existe. Son phénotypage semble très complexe puisqu'il demande l'étude d'une multitude de fonctions face à des perturbations variées. Cependant par une approche hiérarchique, il semble possible d'apporter des indications quant à la robustesse d'un individu en décrivant les niveaux sous-jacents de la robustesse. La Figure 8 propose une telle approche issue des définitions apportées dans la partie précédente et résumées ci-dessous.

Nous avons vu dans cette première partie que la robustesse d'un système était permise par la capacité de ses mécanismes adaptatifs à faire face aux perturbations environnementales (capacité adaptative). Décrire la capacité adaptative des individus permet donc d'apporter des indications fiables sur leur robustesse. Cette capacité est déterminée par le génotype de l'animal et son environnement (histoire de vie). Associée à une perturbation environnementale donnée, elle détermine un degré de perturbation de l'animal qui se traduit par un ensemble de réponses adaptatives.

Ainsi, en connaissant la force d'une perturbation effectuée de façon artificielle dans des conditions contrôlées, il semble possible de déduire la capacité adaptative à partir du degré de perturbation de l'animal et donc d'apporter des éléments de réponse sur sa robustesse. Nous appellerons **challenge** la perturbation réalisée de façon artificielle et contrôlée permettant de décrire la capacité adaptative du système. Le degré de perturbation est estimé en intégrant les caractéristiques des réponses à un challenge. Pour cela, il faut être capable de décrire l'amplitude des réponses face au challenge et la capacité à récupérer. Des cinétiques des différentes réponses adaptatives doivent donc être réalisées face au challenge effectué.

Deux principales difficultés sont rencontrées dans une analyse de ce type : caractériser une cinétique de réponse et comparer des réponses de nature variée.

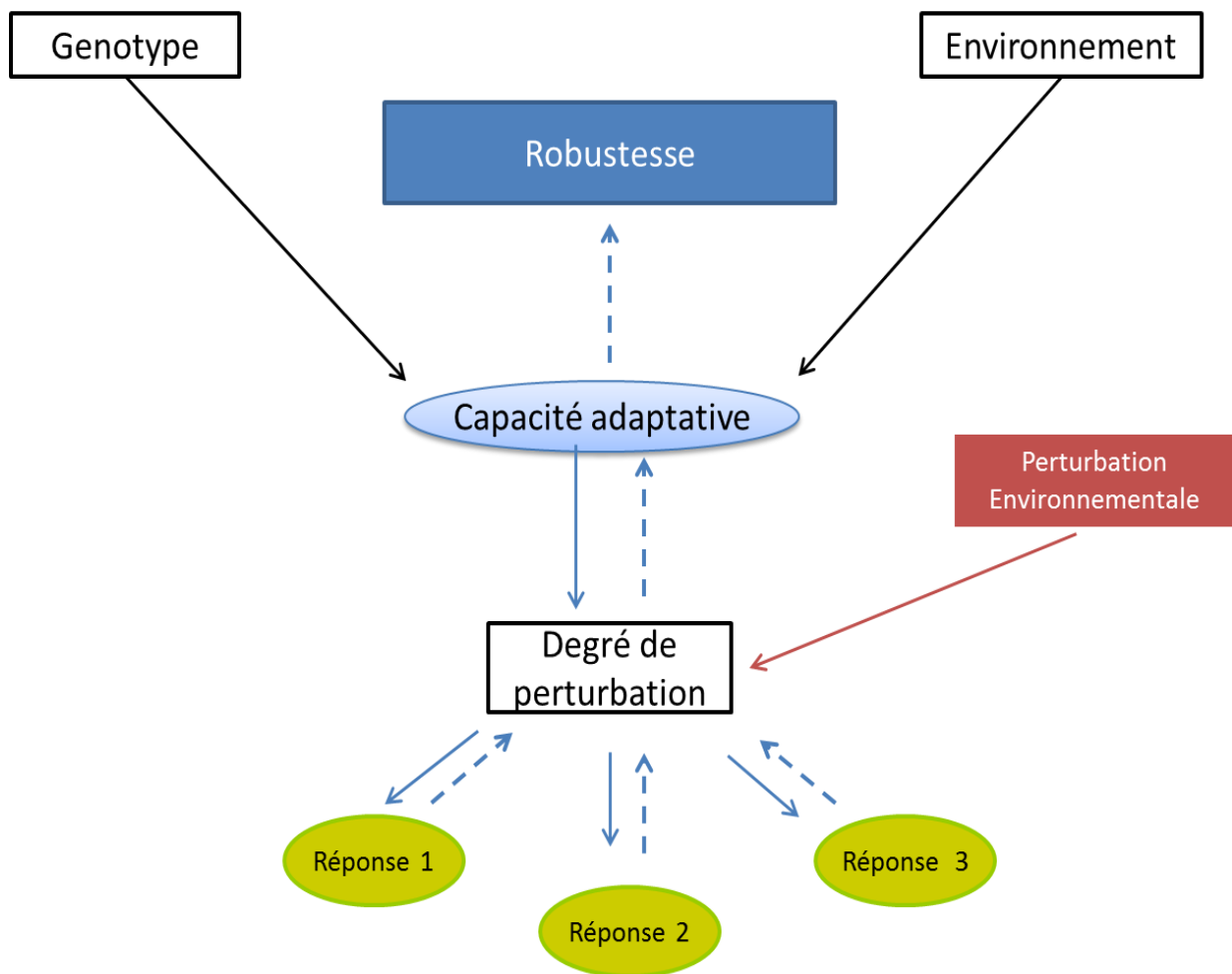


Figure 8. Approche hiérarchique pour décrire la robustesse.

Les flèches pleines représentent des liens directs, les flèches en pointillés représentent le chemin permettant de décrire la robustesse.

2.2 Caractériser des cinétiques de réponses

Décrire des cinétiques de réponses est un défi important dans de nombreuses disciplines. En effet, que ce soit en pharmacologie pour décrire par exemple la clairance d'une substance toxique ou en nutrition humaine pour décrire la sensation de faim après un aliment donné, des cinétiques doivent permettre d'extraire des éléments de réponses permettant de quantifier la toxicité de la substance ou l'effet satiétogène de l'aliment. En biologie, les descriptions de cinétique se font généralement à travers l'utilisation des amplitudes maximums, des aires sous la courbe (AUC) ou des temps de retour à l'état initial (Blundell et al., 2010; Toutain and Bousquet-Mélou, 2004). D'importantes informations sur la forme de la courbe sont notamment perdues et de nouvelles méthodes sont donc mises en place pour mieux décrire ces cinétiques (Schuring et al., 2012).

Nous avons utilisé et adapté dans les chapitres 2 et 3 du manuscrit des outils classiques de statistiques permettant de décrire les cinétiques de réponses de l'organisme face à une perturbation environnementale. Nous avons également choisi de développer un modèle mathématique, décrit dans le chapitre 4, plus précis et plus performant pour réaliser ce travail. Ce modèle doit également être capable de faire ressortir des critères explicites d'amplitude de réponse et de capacité à récupérer permettant de faciliter la caractérisation du degré de perturbation de l'individu. Afin de pouvoir intéresser un grand nombre de scientifiques évaluant l'effet d'une perturbation sur un système, il doit être suffisamment générique pour s'ajuster à de nombreuses réponses issues d'organismes variés.

2.3 Comparer des réactions de natures différentes

Nous avons vu que les réponses adaptatives pouvaient être multiples et de nature variée. L'approche hiérarchique visant à décrire la robustesse à partir de l'intégration de ces réponses nécessite donc de pouvoir combiner les caractéristiques de cinétiques d'unités différentes.

Nous avons donc utilisé des outils d'analyse multivariée simple (analyses en composantes principales) permettant d'intégrer et de comparer les différentes réponses adaptatives entre les individus statistiques étudiés. Dans le chapitre 4, le modèle mathématique envisagé doit être capable de décrire les caractéristiques des cinétiques dans une unité absolue et standardisée facilitant l'étape d'intégration des caractéristiques des réponses. En effet, contrairement aux AUC ou aux valeurs maximums de réponses, dont les

échelles sont arbitraires, une telle unité autoriserait la comparaison entre réponses et l'importance relative de chaque sous-système dans la capacité à faire face à la perturbation.

2.4 La base d'un modèle plus complexe

Le modèle mathématique développé dans le chapitre 4 doit également former une base solide permettant de créer à terme un modèle plus complexe intégrant d'autres potentielles composantes de la robustesse. En effet, ce modèle devra permettre de soulever des hypothèses fortes sur d'autres données telles que l'état physiologique de l'animal, l'impact de son histoire de vie, etc. Inversement, ce modèle « amélioré » permettra de commencer à prédire les réponses des organismes face à des perturbations de plus longues durées ou face à des perturbations accumulées. Des notions indispensables à l'étude de la robustesse pourront alors être abordées telles que l'accumulation de perturbations, l'assimilation, ou encore l'habituation.

2.5 Utilisation de la truite arc-en-ciel comme modèle d'étude

L'ensemble des travaux de cette thèse ont été réalisés sur la truite arc-en-ciel. Outre son importance agronomique, cette espèce présente de nombreux avantages pour la mise en place d'un travail sur la robustesse et les capacités adaptatives. En effet, leur coût d'entretien est inférieur à beaucoup de vertébrés et permet donc de suivre en parallèle un grand nombre d'individus contrairement aux études chez les ruminants par exemple. De plus, leurs capacités de reproduction sont très importantes, puisqu'avec une femelle et un mâle, il est possible d'obtenir facilement plus d'un millier de descendants, permettant de supprimer les effets parentaux. Il existe également des lignées isogéniques de truite arc-en-ciel au sein desquelles tous les individus présentent le même génome (Quillet et al., 1991). Il s'agit donc là d'outils formidables permettant de s'affranchir entièrement de l'effet génétique, et de ne conserver plus que l'effet environnemental.

Enfin, la truite arc-en-ciel est une espèce de plus en plus étudiée et donc ses réponses adaptatives lui permettant de faire face aux perturbations environnementales sont très bien décrites.

3 La truite arc-en-ciel face à la variation de son environnement

La truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, est une espèce originaire de la côte ouest de l'Amérique du Nord. Elle fut introduite dans de nombreux pays, dont la France en 1874, pour la consommation humaine et la pêche de loisir. La truite arc-en-ciel représente maintenant la première production piscicole française avec environ 30 000 tonnes produites chaque année (FAO, 2012). Au niveau mondial, 856 000 tonnes ont été produites en 2012 (FAO, 2012). De la famille des salmonidés, la truite arc-en-ciel constitue également un excellent modèle pour le saumon d'élevage, dont la production dépasse les 90 000 000 de tonnes (FAO, 2012). La truite arc-en-ciel sauvage présente une forme anadrome appelée « steelhead trout » se reproduisant en eau douce après avoir passé plusieurs années en eau de mer. Cependant, en élevage, elle est principalement élevée en eau douce jusqu'à des tailles d'environ 300g. En raison d'une croissance rapide de l'espèce en eau salée, quelques élevages sont réalisés en eau de mer à partir de 100g jusqu'à plusieurs kilos (EFSA, 2008).

Globalement, la truite arc-en-ciel est connue pour sa croissance rapide et ses capacités d'adaptation à des conditions variées, et à des conditions d'élevage relativement intensives.

3.1 Les variations de qualité d'eau

Les concentrations de dioxygène dans l'eau sont globalement bien inférieures à celles rencontrées dans l'air. Comparativement aux espèces terrestres, les espèces aquatiques disposent donc généralement de grandes surfaces d'échange leur permettant d'extraire le dioxygène de l'eau (Maina, 2002). Cependant, cette importante quantité d'épithélium respiratoire les rend plus exposées aux variations physico-chimiques de l'eau. Pourtant, les outils permettant de suivre et de gérer les variations des paramètres de qualité d'eau sont encore relativement limités et les espèces aquacoles doivent donc faire face à d'importantes variations de la qualité d'eau (MacIntyre et al., 2008). Les gammes de tolérance de la truite arc-en-ciel sont cependant connues et montrent que l'espèce est, malgré tout, capable de s'acclimater à des milieux très variés (Wedemeyer, 1997).

En effet, bien que les valeurs optimales soient relativement précises, les études montrent que la truite peut, par exemple, survivre à des gammes de température, salinité, pH ou dioxygène importantes (Tableau 1). Les valeurs du Tableau 1 sont données à titre indicatif

puisque'elles sont largement dépendantes de facteurs génétiques et environnementaux, du stade de vie de l'animal ou de son histoire de vie (Wedemeyer, 1997).

Il a, par exemple, été montré que la température d'élevage au stade larvaire pouvait influencer à long terme la capacité à faire face à un challenge hypoxique chez la sole (Zambonino-Infante et al., 2013). L'identification de Quantitative Trait Loci (QTL) pour la capacité à faire face à un challenge de salinité démontre également l'existence d'une composante génétique de la tolérance à la salinité chez les poissons (Le Bras et al., 2011; Norman et al., 2011). Il est également connu que des truitelles de 50g ont beaucoup plus de mal à s'adapter à un challenge de salinité que des truitelles de 100g (Boeuf, 1993a). Enfin, les combinaisons de plusieurs valeurs extrêmes présentées dans le Tableau 1 sont difficilement tolérées par la truite arc-en-ciel (Finstad et al., 1988).

Tableau 1. Ordre de grandeur de la tolérance de la truite arc-en-ciel pour 4 paramètres de la qualité d'eau.

	Valeurs optimales (en eau douce)	Valeurs Extrêmes	Publications
Température	16-17 °C	0-26 °C	(Wedemeyer, 1997)
Salinité	variables	0-35 ‰	(Boeuf, 1993a, 1993b)
pH	>6	4,5-10	(Ikuta et al., 1992; Jordan and Lloyd, 1964; Randall and Lin, 1993; Wilkie and Wood, 1996)
Dioxygène	6-10 mg/L	<2,6 mg/L	(Thurston et al., 1981)

Les exemples donnés dans le Tableau 1 montrent la capacité de la truite arc-en-ciel à survivre à des environnements extrêmes qu'elle peut rencontrer en milieu naturel ou parfois dans des conditions d'élevage anormales. Globalement, la filière piscicole propose des qualités d'eau proches des valeurs optimales favorisant la production (Wedemeyer, 1997). Cependant, la truite doit faire face à des variations périodiques autour de ces valeurs optimales. La distribution alimentaire, le rythme circadien des poissons, ou encore la saison

peuvent, par exemple, entraîner des modifications de l'environnement des poissons. Au cours d'une année, la température de l'eau en entrée des bassins de la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée (PEIMA) peut, par exemple, varier du simple au triple (Figure 10). De la même façon, la quantité d'oxygène est très variable au cours de la journée, dans un circuit d'eau recirculée de la PEIMA (Figure 9). Il s'agit là de perturbations environnementales normales auxquelles les poissons doivent faire face. De nombreux autres paramètres de la qualité de l'eau peuvent varier de la même façon, ils sont référencés dans le rapport de l'EFSA sur le bien-être de la truite en élevage (EFSA, 2008).

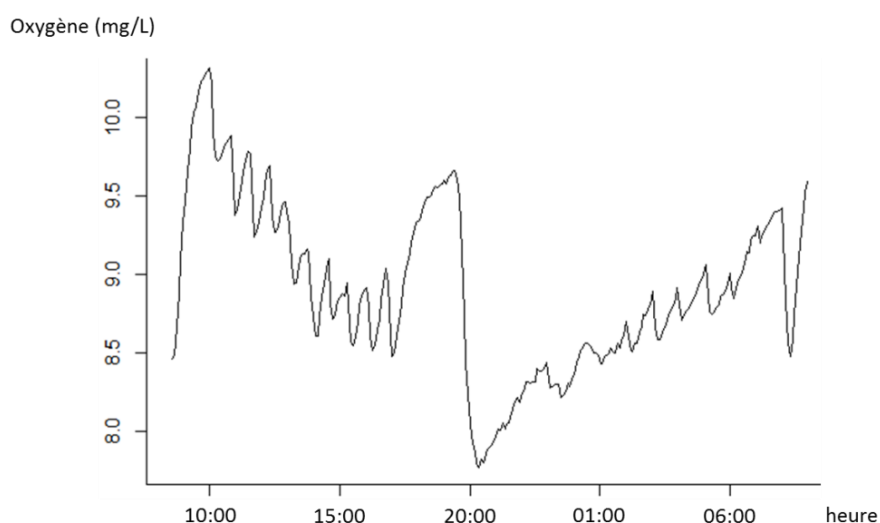


Figure 9. Variations sur 24 heures de la concentration en dioxygène dans un bassin d'eau recirculée de la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée.

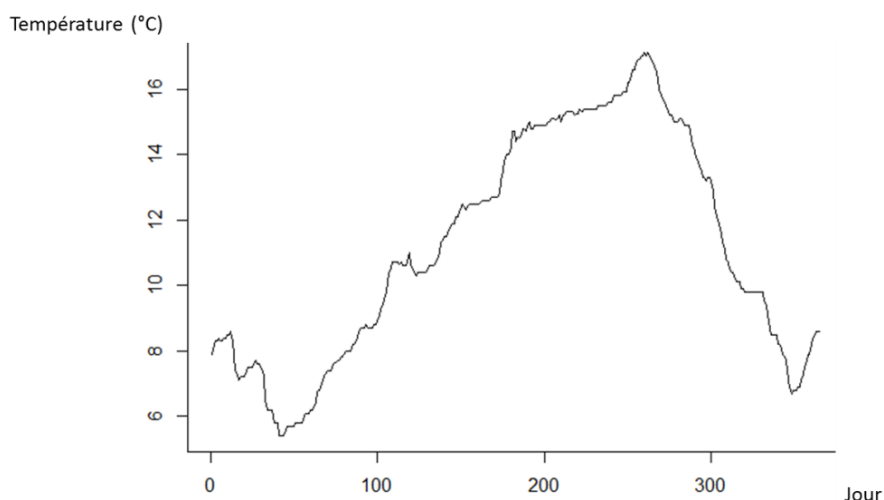


Figure 10. Variations de la température de l'eau entrante à la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée au cours de l'année 2012.

3.2 Les perturbations environnementales liées aux pratiques d'élevage

Outre les variations de la qualité d'eau, la truite arc-en-ciel doit faire face à d'importantes perturbations de son environnement liées aux pratiques d'élevage. En effet, l'élevage piscicole nécessite de réaliser de nombreuses opérations de routine telles que des nettoyages des bacs d'élevage, des transferts de poissons, des pesées, le remplissage des distributeurs automatiques, etc... Toutes ces actions sont de potentielles perturbations pour les poissons que l'on peut considérer comme des variations environnementales (Pickering, 1992). La Figure 11 illustre, par exemple, les variations de densité d'élevage aux jeunes stades subies par des poissons élevés à la PEIMA.

Ainsi, que ce soit lié aux modifications de qualité d'eau ou aux pratiques d'élevage, les animaux doivent périodiquement faire face à de nombreuses perturbations de leur environnement. Lorsque ces perturbations sont considérées comme menaçantes par l'animal, des réponses adaptatives physiologiques et comportementales sont mises en place permettant de faire face à la perturbation.

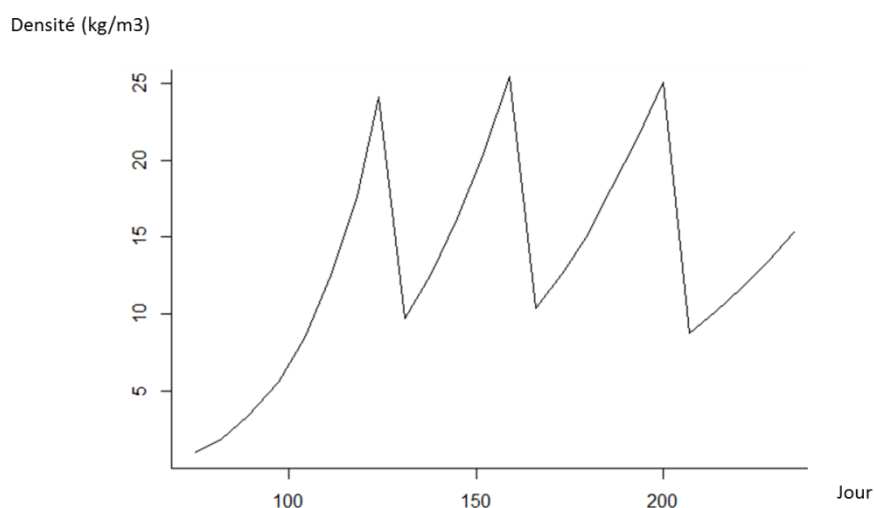


Figure 11. Exemple de variation de la densité durant les 150 premiers jours de l'élevage d'une lignée isogénique de truites arc-en-ciel à la Pisciculture Expérimentale INRA des Monts d'Arrée

3.3 Les réponses face à une perturbation

Le nombre d'articles s'intéressant à l'effet d'une perturbation sur les réponses physiologiques et comportementales chez les poissons est très important. Cette partie présente donc un résumé de la littérature qui est loin d'être exhaustif mais qui me semble important pour la suite du manuscrit.

Il est couramment admis qu'une série de réponses se met en place lors d'une perturbation environnementale (Evans and Claiborne, 2005). Ces réponses sont globalement identiques pour tous les types de perturbation et font notamment intervenir le système neuroendocrinien, les paramètres métaboliques de l'animal et son comportement.

3.3.1 Le système neuroendocrinien

Chez le poisson, les systèmes neuroendocriniens impliqués dans la réponse aux perturbations sont divisés en deux principales voies formées de deux axes distincts, très proches de ceux observés chez les autres vertébrés (Bonga, 1997).

Lorsqu'une perturbation de l'environnement est détectée, l'**axe sympatho-adrénergique** (SA), est immédiatement activé, entraînant l'augmentation de la concentration plasmatique de catécholamines (Figure 12). Cette réaction est très rapide, de l'ordre de quelques secondes, puisqu'elle est le résultat de la libération des stocks de catécholamines des cellules chromaffines situées dans le rein antérieur (Pankhurst, 2011; Reid et al., 1998). La rapidité de l'augmentation de l'adrénaline rend difficile sa mesure au niveau basal. En effet, le stress lié au prélèvement sanguin suffit à faire monter les taux de catécholamines.

En parallèle, l'**axe hypothalamo-hypophysaire-interrenale** (HPI) est également mis à contribution. Le corticotropin-releasing factor (CRF) est notamment sécrété par l'hypothalamus lors d'une perturbation environnementale et agit sur l'hypophyse stimulant la libération d'adrenocorticotropin hormone (ACTH) (Bonga, 1997). L'ACTH stimule la synthèse et la sécrétion de cortisol par les cellules interrénales (Figure 12). Cette cascade de réactions entraîne l'augmentation de la concentration plasmatique de cortisol quelques minutes après la perturbation (Pankhurst, 2011). Ce délai est donc supérieur à celui des catécholamines et facilite sa mesure. Le cortisol plasmatique est donc devenu l'un des indicateurs de stress les plus couramment utilisés chez le poisson.

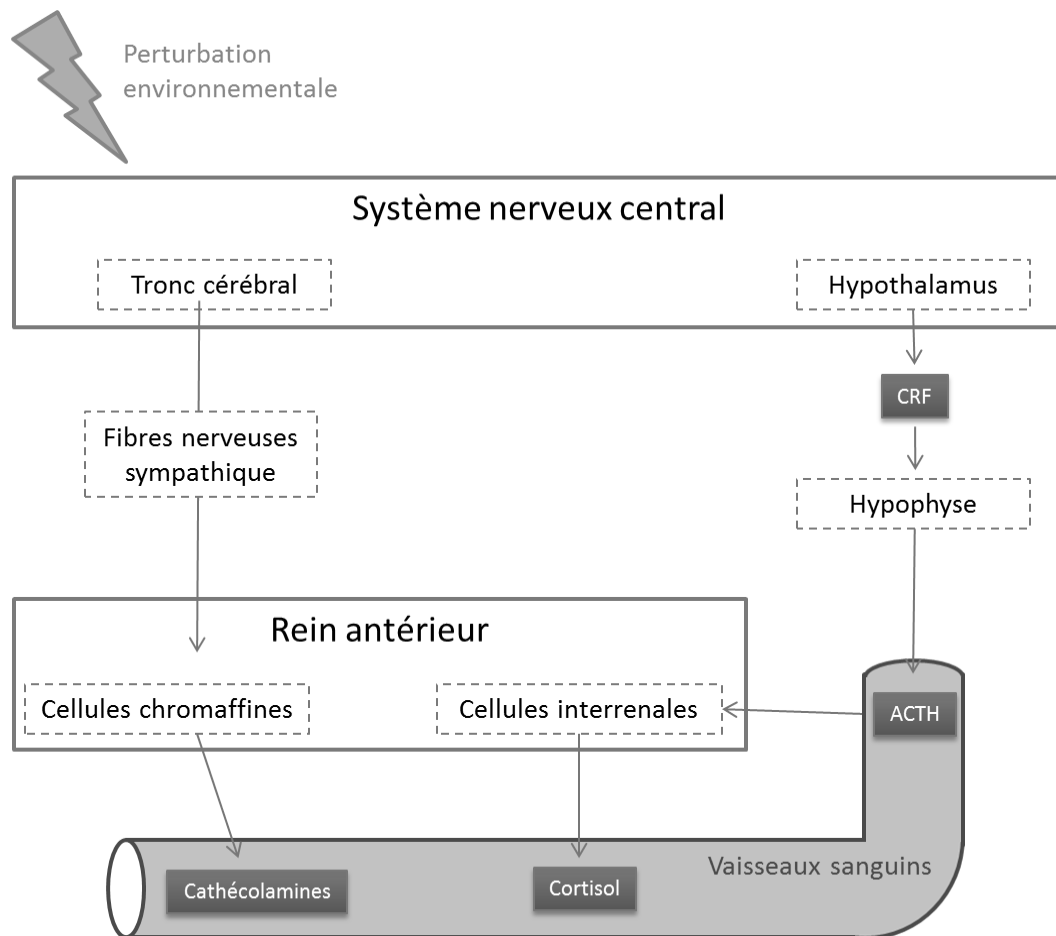


Figure 12. Représentation schématique des axes de réponses du système neuroendocrinien à une perturbation environnementale.

CRF : Corticotropin-Releasing Factor. ACTH : Adrenocorticotropin Hormone.

(Adapté de Wendelaar Bonga, 1997).

3.3.2 Réponses métaboliques

Lors d'une perturbation, plusieurs mécanismes adaptatifs sont activés par les réponses du système neuroendocrinien et permettent de répondre à des besoins accrus en énergie et oxygène nécessaires à la fuite ou à la mise en place d'autres mécanismes adaptatifs (Auperin and Boeuf, 2010; McKenzie, 2011).

Les catécholamines augmentent les capacités respiratoires des poissons en modifiant le rythme cardiaque, la vitesse de ventilation, le flux de sang dans les branchies, les capacités de l'oxygène à diffuser à travers l'épithélium branchial et l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (Bonga, 1997; Nikinmaa, 1992; Steffensen et al., 1987). Ces catécholamines induisent également une hyperglycémie en stimulant par exemple la dégradation de glycogène entraînant ainsi une augmentation des taux plasmatiques de glucose (Barton and Iwama, 1991).

Le cortisol, sécrété après les catécholamines, intervient dans le métabolisme énergétique ainsi que dans la régulation de la balance hydrominérale, perturbée indirectement par la sécrétion de catécholamines (Pankhurst, 2011). Ces dernières, en augmentant le flux sanguin branchial, facilitent la perte passive d'ions et l'entrée d'eau dans le poisson selon le gradient d'osmose à travers les épithéliums branchiaux. Ces mouvements passifs de sels et d'eau induisent une perturbation de l'homéostasie ionique et hydrique des poissons. Le cortisol, en activant les flux actifs de sels et en modifiant la perméabilité branchiale par remodelage des épithéliums, permet de rééquilibrer la balance hydrominérale des poissons (Laurent et Perry 1990; McCormick et al 2008). Le déséquilibre de la balance hydrominérale et de sa régulation ont été mis en évidence grâce à l'étude chez la truite arc-en-ciel des effets de diverses perturbations telles qu'un exercice physique, un confinement, une modification de la salinité ou de la température (Croke and McDonald, 2002; Postlethwaite and McDonald, 1995; Ruane et al., 1999; Woodward and Strange, 1987). Ces études ont été réalisées grâce à la mesure de flux ioniques branchiaux ou de contenus plasmatiques ou totaux en ions.

3.3.3 Les réponses comportementales

De nombreuses perturbations environnementales chimiques ou physiques peuvent affecter le comportement des poissons (Schreck et al., 1997). Ainsi, il est couramment admis que la première ligne de défense des individus face à une perturbation est une défense comportementale permettant d'échapper à la perturbation ou de réguler son métabolisme.

Cependant, toute réponse comportementale fait suite à des stimulations générées par les processus neurologiques et endocriniens décrits précédemment.

La réponse comportementale à une perturbation peut être presque instantanée si elle est activée directement par le système neuronal. Il s'agit par exemple de la réponse face à un prédateur, entraînant une modification soudaine du comportement de la proie, qui cherche alors à fuir, se cacher ou s'immobiliser. D'autres contraintes environnementales, comme l'hypoxie, des changements de température ou de lumière peuvent également modifier l'activité de nage des poissons ou la dispersion et la position du groupe dans l'aquarium (Bui et al., 2013; Hasler et al., 2009; Xu et al., 2006). Ces modifications du comportement permettent généralement d'augmenter les chances de survie ou encore de diminuer le coût métabolique lié à la perturbation. Indirectement, un contrôle rétroactif sur la perception du challenge ou le métabolisme est donc mis en place.

Depuis plusieurs décennies chez les animaux de rente, et plus récemment en aquaculture, le comportement est également utilisé comme un indicateur du bien-être animal. En effet, lorsque l'animal est en situation de mal-être, liée par exemple à une répétition de perturbations ou à une perturbation qui dure dans le temps -on parle alors de perturbation chronique-, son comportement peut devenir non approprié, et être décrit comme maladaptatif (Martins et al., 2012). Les comportements de fuite face à un prédateur ou à une soudaine diminution de la qualité d'eau décrits précédemment peuvent alors être perturbés. Il a par exemple été montré que la capacité à fuir un prédateur était fortement affectée lorsque les poissons étaient soumis à des doses élevées de substances toxiques durant plusieurs jours (voir revue de Scott and Sloman, 2004). De la même façon, la motivation alimentaire et la quantité ingérée sont fortement diminuées lorsque le bien-être est affecté (Folkedal et al., 2012a). Il a également été montré que les performances d'apprentissage, celles-ci jouant un rôle critique dans la survie de l'animal et dans la réalisation de comportements naturels, sont affectées lorsque le bien-être est dégradé (Spruijt et al., 2001).

3.3.4 Le « coping style » : des relations entre réponses

Nous avons vu que les réponses endocriniennes, métaboliques et comportementales étaient liées les unes aux autres via des systèmes de régulations directs et indirects. Il semble donc possible d'imaginer une consistance entre les différentes réponses au sein d'une même population.

Le *coping style* fait justement référence à « un ensemble cohérent de réponses comportementales et physiologiques qui est stable dans le temps et caractéristique d'un groupe d'individus » (Koolhaas et al., 1999). Deux catégories extrêmes de *coping style* ont été décrites : les proactifs et les réactifs (Tableau 2).

Tableau 2. Différences comportementales et physiologiques relatives entre les individus proactifs et réactifs.

HPI : axe hypothalamo-hypophysaire-interrénale ; SA : axe sympatho-adrénargique.

(Adapté de Koolhaas et al., 1999)

Paramètres	Proactif	Réactif
Aggressivité face à un intrus	+	-
Dominance	+	-
Craintif	-	+
Activité	+	-
Réactivité de l'axe HPI	-	+
Réactivité de l'axe SA	+	-

Globalement, les individus réactifs sont caractérisés par une acceptation plus importante de la modification environnementale, que les individus proactifs, avec généralement peu de prises d'initiatives mais un axe HPI très réactif. Dans un environnement stable et abondant, les individus proactifs sont considérés comme avantagés (revue de Koolhaas et al., 2007). L'existence de *coping style* a été observée chez les truites arc-en-ciel par l'équipe de Pottinger (Øverli et al., 2004, 2005; Pottinger and Carrick, 2001). Ces auteurs ont à travers leurs travaux de sélections également démontré les bases génétiques du *coping style*.

3.4 Les lignées isogéniques

La notion de *coping style* introduit l'idée que des différences de comportement et de physiologie existent au sein d'une même population avec des individus étant considérés comme réactifs, d'autres comme proactifs. Les raisons de cette variabilité de réponses sont principalement liées aux différences de génotypes, d'histoire de vie et d'environnement mais également à leurs interactions. Ces différences compliquent l'étude des effets relatifs de l'environnement et du génotype sur les capacités des animaux à faire face. Ainsi, afin de supprimer les variabilités phénotypiques liées au génome, des lignées isogéniques, au sein

desquelles tous les individus présentent le même génotype, sont disponibles chez la truite arc-en-ciel. Les reproducteurs sont issus de lignées homozygotes élevées à la PEIMA (Quillet et al., 2007). Ces lignées ont été obtenues suite à deux générations de gynogenèses (voir revue Komen and Thorgaard, 2007) et stabilisées par fécondation intralignée en utilisant des néo-mâles, c'est-à-dire des femelles génétiques sexuellement inversées par une alimentation contenant de la méthyltestostérone. Les lignées isogéniques généralement utilisées dans les expériences sont hétérozygotes permettant l'expression d'un phénotype normal. Ces lignées proviennent d'une femelle et d'un néo-mâle de lignées homozygotes différentes. Au sein de chaque lignée tous les individus ont le même patrimoine génétique.

3.4.1 Utilisation pour la mesure de la sensibilité à l'environnement

Ce matériel génétique est donc un excellent outil pour comprendre et explorer le rôle relatif du génotype et de l'environnement dans le déterminisme du phénotype (Vrijenhoek, 1994). En effet, si l'on se base sur l'équation (1) et en estimant que la variabilité génotypique (VG) au sein d'une lignée est nulle on peut en déduire que la totalité de la variabilité phénotypique (VP) d'une lignée est liée à des variations de l'environnement (VE) (2).

$$(1) VP = VE + VG + VEG$$

$$(2) VP = VE \text{ si la } VG=0$$

Avec VEG la variabilité liée à l'interaction environnement \times génotype.

Ainsi, la variabilité phénotypique intra-lignée est une mesure directe de la variabilité environnementale. De récentes études s'intéressent à la comparaison entre lignées d'un phénotype donné, le poids, et font le parallèle entre la variabilité phénotypique et la sensibilité à l'environnement (Dupont-Nivet et al., 2009).

3.4.2 Caractérisation des lignées B57-A22 et B57-R23

Des lignées isogéniques hétérozygotes de truite arc-en-ciel ont été précédemment caractérisées pour leur capacité à faire face à un aliment 100% végétal (Geurden et al., 2013). Ce challenge alimentaire est reconnu comme étant une perturbation forte chez la truite, initialement carnivore, se traduisant par une diminution importante de la croissance (Le Boucher et al., 2011; Powell, 2003). L'étude de Geurden et al. (Geurden et al., 2013) s'intéresse à l'effet de 25 jours d'aliments 100% végétal sur deux lignées hétérozygotes de truites arc-en-ciel, B57-A22 et B57-R23, que l'on nommera respectivement A et R. Ces

lignées sont issues des œufs d'une femelle homozygote de la lignée B57, et du sperme d'un néo-mâle de la lignée A22 ou R23. Les résultats montrent que la lignée A présente une croissance deux fois plus importante durant la période du challenge que la lignée R (Figure 13).

Les deux lignées semblent donc montrer des capacités très différentes à faire face à un challenge alimentaire. Ces différences traduisent-elles des différences de robustesse ?

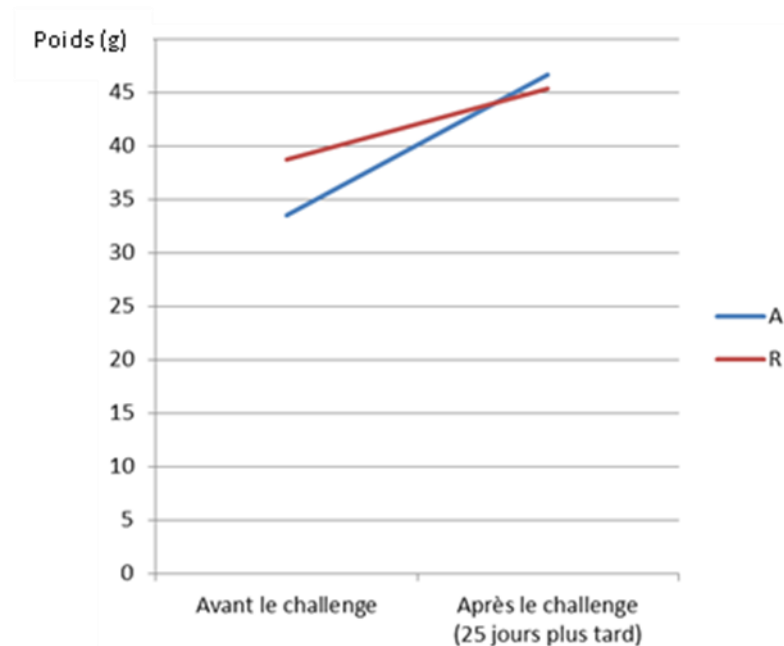


Figure 13. Poids avant et après un challenge de 25 jours avec 100% d'aliment végétal sur deux lignées de truite arc-en-ciel (A et R).

4 Objectifs de l'étude

Nous avons vu l'importance de la robustesse en production animale et les efforts scientifiques fournis pour l'améliorer. Depuis plusieurs années, la principale stratégie d'amélioration de la robustesse repose sur l'intégration de traits fonctionnels dans les programmes de sélection. En effet, les améliorations génétiques de la solidité des pattes pour les poulets de chair, de l'immunorésistance pour le porc ou de l'agressivité chez les poules, sont, par exemple, envisageables lorsque ces traits sont héréditaires et inclus dans des programmes de sélection (Knap, 2009; Star et al., 2008). Cette stratégie peut permettre d'améliorer de façon moyenne la performance de ces traits spécifiques dans un contexte spécifique. Dans des conditions différentes avec de nouvelles perturbations, rien n'indique

que ces performances sont conservées. Dans le cadre de ce projet, nous proposons une stratégie complémentaire qui consiste à aborder la robustesse par une voie détournée en s'intéressant, non pas à l'évaluation des fonctions du système, mais à la description de son état face à des perturbations environnementales. Comme indiqué, dans la Figure 8, nous cherchons à apporter par une approche hiérarchique des informations quant à la robustesse du système à travers l'étude de ses capacités adaptatives. Nous faisons l'hypothèse que cette approche est plus générique puisqu'un état peut définir un ensemble de fonctions. En effet, un système biologique qui n'est pas capable de faire face à une perturbation environnementale peut voir l'ensemble de ses fonctions d'intérêt diminuer.

Ce travail doit permettre, à terme, de développer de nouvelles définitions opérationnelles de la robustesse, c'est-à-dire des définitions quantifiables et génériques par rapport à différentes conditions de challenges. Ainsi, afin d'apporter des indications quant à sa robustesse, nous avons décrit le degré de perturbation de l'animal face à des perturbations environnementales, grâce à des données sur sa sensibilité à l'environnement ou sa capacité à récupérer. Nous avons travaillé sur les deux lignées isogéniques A et R de truites arc-en-ciel, au sein desquelles tous les individus présentent le même génotype, afin de vérifier les divergences supposées de robustesse et de pouvoir comparer les effets relatifs du génotype et de l'environnement sur les capacités à faire face aux perturbations.

Comme décrit dans les parties 1.3.1 et 1.3.2, la capacité adaptative ou encore le degré de perturbation font intervenir de nombreuses réponses adaptatives, qui doivent être suivies avant, pendant et après une perturbation environnementale. Les objectifs du projet de thèse ont donc consisté à :

- (1) Créer ou adapter des méthodes permettant de suivre les réponses adaptatives au cours du temps chez la truite arc-en-ciel. Ces méthodes devaient de préférence être non invasives et non intrusives afin de pouvoir décrire les variabilités de réponses entre individus.
- (2) Mesurer, en utilisant les méthodes développées dans (1), les réponses des deux lignées isogéniques de truite arc-en-ciel à une perturbation environnementale.
- (3) Extraire, à partir des cinétiques de réponses obtenues en (2) les caractéristiques décrivant chacune des réponses.
- (4) Combiner les caractéristiques obtenues en (3) pour déterminer le degré de perturbation des individus étudiés.

CHAPITRE 1

Mise en place des outils de suivi en continu des mécanismes adaptatifs

1 Développement d'un outil de suivi en continu du comportement en groupe des poissons

L'étude de la capacité à faire face à une perturbation environnementale nécessite l'obtention de mesures réalisées avant pendant et après cette perturbation. Afin de ne pas interférer dans les cinétiques de réponses, ces mesures sont idéalement non invasives et non-intrusives. La mesure des variations comportementales nécessitant uniquement de filmer et d'analyser les vidéos représente donc un outil très adapté. Dans l'optique d'une analyse quantitative de la réponse, la mesure doit être objective, quantitative et fréquente.

Dans ce sens, de nombreuses méthodes ont été développées afin de mesurer le comportement des poissons (Bégout et al., 2012). Les dernières méthodes proposées semblent être très puissantes pour suivre plusieurs individus dans un aquarium (Pérez-Escudero et al., 2014). Cependant, ces outils ne sont pas adaptés aux conditions rencontrées en élevage, c'est-à-dire dès lors que la densité de poissons augmente. Dans ces conditions, du fait des recouvrements fréquents de poissons, il est très compliqué de les identifier individuellement. Cependant, il est envisageable d'obtenir, lorsque la densité est forte, des estimations du comportement en groupe des poissons sans obtenir de données individuelles (Israeli and Kimmel, 1996; Stien et al., 2007). Nous avons donc choisi de développer un outil informatique capable de mesurer de façon automatique le comportement du groupe de poissons à partir d'enregistrements vidéo obtenus par une caméra positionnée au-dessus des bassins.

L'outil d'observation automatisée du comportement des poissons présenté dans l'article 1 est capable d'extraire un indice d'activité et un indice de dispersion du groupe à partir d'une suite d'images issues d'une séquence vidéo. Fondée sur un algorithme simple codé avec le logiciel gratuit ImageJ, cette méthode s'est montrée sensible aux modifications visuelles du comportement en groupe des poissons. En effet, l'outil a été testé sur des vidéos de poissons soudainement nourris par un distributeur automatique d'aliment. Les résultats montrent, comme attendu, une augmentation transitoire et rapide de l'activité ainsi qu'un fort regroupement des poissons. De même, dans une expérience où les poissons ont été confinés pendant 4h dans une épuisette, l'outil a été capable de mesurer une modification de leur comportement après le confinement. Enfin, la méthode a été testée sur des simulations du comportement d'un groupe de poissons. Ces simulations, construites en suivant les règles de

Reynold's relatives aux mouvements des troupeaux et des bancs de poissons ou d'oiseaux (Reynolds, 1987), ont permis de créer des vidéos dans lesquels se déplacent des poissons artificiels dont on connaît les coordonnées exactes et donc les vitesses et les distances inter-individuelles. Les vidéos des simulations ont ensuite été analysées en utilisant la méthode présentée dans l'article et les résultats ont été comparés avec les données. L'outil s'est montré très fiable et sensible aux variations de comportement du groupe de poissons, qu'ils soient observés en situations réelles ou en simulation.

L'outil a été optimisé pour faciliter son utilisation et ne nécessite pas de connaissances particulières en codage informatique. Des boîtes de dialogues permettent ainsi de demander à l'utilisateur les informations essentielles à l'analyse. Les résultats sont ensuite stockés dans un fichier texte directement analysable par les logiciels classiques d'analyses statistiques.

Ces travaux ont été publiés dans la revue *Aquaculture* en 2014. L'article est présenté dans la suite de ce chapitre.

A new method for measuring group behaviours of fish shoals from recorded videos taken in near aquaculture conditions

B. Sadoul^{1*}, P. Evouna Mengues¹, N.C. Friggens^{2,3}, P. Prunet¹, V. Colson¹

¹ INRA, LPGP Fish Physiology and Genomics UR1037, Rennes, France

² INRA, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

³ AgroParisTech, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

*Corresponding author. Email address: bsadoul@rennes.inra.fr

Abstract

Monitoring fish shoal behaviour is a growing concern for scientists studying fish stress and welfare. This study presents an algorithm developed to calculate, from videos taken from above aquaria, two indexes characterizing fish shoal behaviour. These two indexes quantify the dispersion and the swimming activity of the fish shoal in the aquaria. The reliability of these indexes was tested on fish shoal simulations following the rules of Reynold's model on flocks, herds and schools. Since coordinates of each simulated fish in the shoal was known, these simulations provided true values of dispersion and swimming speed of each fish in the shoal, which were compared to values calculated using the presented algorithm. Further, the two indexes were tested on videos of rainbow trout in aquaria. Behavioral variations of the shoal were estimated before and after food distribution in one test, and before and after a four hours confinement stress in a second test. Data resulting from simulations indicate that the two indexes are sensitive to the simulated changes in the cohesion or the swimming speed of the group. Thus, indexes faithfully translated true values in simulations, with a minimum of 94% of the total variation in true values explained by indexes. Furthermore, the two indexes were sensitive to shoal behaviour modifications observed in the two case studies. Indeed, as expected, a strong group dispersion decrease associated with an important swimming activity increase could be detected just after food distribution using our method. Similarly, our indexes were sensitive to a group behaviour change observed after the four hours confinement stress. Finally, our method was compared to Israeli's, and was found to be more sensitive and more accurate in our conditions. This method provides therefore a sensitive, non-invasive, simple and widely applicable tool to quantify behavioural changes associated with various challenges in aquacultural conditions.

Keywords

Monitoring, trout, simulation, confinement, stress

1. Introduction

Stress is now well documented for its deleterious effect on health and growth of cultured fish (Dror et al., 2006; Iwama et al., 1997; Pankhurst et al., 1997; Welker et al., 2007). Some factors such as water quality, stocking density or physical disturbances can act as powerful environmental stressors, thereby reducing the performance and the welfare of the fish. Behaviour is the first visible change after exposure to a stressor and has proven to be a sensitive indicator of environmental conditions and animal welfare in ecosystems or controlled conditions (Atchison et al., 1987; Hasler et al., 2009; Lee et al., 2003; Scherer, 1992). Monitoring behaviour can therefore help to detect perturbations such as physical or chemical disturbances and might provide researchers and farmers with efficient and accurate information on the magnitude of an environmental or social change.

In fish species, some behaviour such as swimming activity, group distribution or space use are commonly considered as stress indicators since they reflect defense behaviour mechanisms increasing survival probability (Almazán-Rueda et al., 2005; Espmark and Baeverfjord, 2009; Lima and Dill, 1990; Martins et al., 2012). Therefore, a challenging situation usually leads to modifications of swimming and shoaling behaviour (Brodin et al., 2013; Hoare et al., 2004; Koltes, 1985; Kramer, 1987; Weis and Weis, 1974a, 1974b).

To observe animal behaviour, manual methods consisting in writing down observations directly or from recorded videos are time-consuming but remain the only way to detect and number the occurrences of some specific behaviour. During the last decade, important improvements have been made to automate as much as possible measurements on isolated individuals (Huntingford et al., 2011). Video tracking was developed and allowed the measurement of several behaviours such as speed, changing directions, time spent moving or angular velocity on an isolated individual (Kane et al., 2004; Schjolden et al., 2005).

Fish group behaviour still remains very challenging to assess since fish move in a three dimensional environment, difficult to access. Recently, methods have been developed to enable the tracking of several fish in the same tank but these methods are either invasive,

potentially disturbing or need restricting conditions. Indeed, a common solution consists in marking few fish within a shoal and following their behaviour semi-automatically with Elastomers (Colléter and Brown, 2011; Doupé et al., 2003; Geffroy and Bardonnnet, 2012) or automatically with electronic marks (Bégout Anras and Lagardère, 2004; Kristiansen et al., 2004). These methods are reliable and efficient but the number of followed individuals remains low and moreover, a probable behavioural bias exists due to surgery. A second solution relies on algorithms capable of tracking individual fish within a shoal by estimating their trajectory from videos (Barry, 2012; Butail and Paley, 2012; Delcourt et al., 2009; Faucher et al., 2010; Johansson et al., 2009). A good algorithm is able to follow more than hundred fish at the time but these methods need low density conditions to avoid formation of large groups and are therefore not reliable in aquaculture conditions.

All the above mentioned methods are based upon tracking single individuals in a group. An alternative to these tracking devices is a method based upon group behaviour monitoring without any recognition of individual fish, giving a global value of the shoal behaviour. Some studies inspired from acoustic technics investigating fish abundances and behaviors in the oceans proved the feasibility of monitoring fish shoal in aquaculture cages (Juell et al., 2003; Oppedal et al., 2007) or tanks (Conti et al., 2006; Rosny and Roux, 2001) using acoustics. However, a number of limitations for tank use were discussed by the authors, indicating the difficulty to apply the technique to aquaculture conditions. Another approach consists in recording videos from the tank and analysing fish shoal behaviour using an automated algorithm. This approach is commonly used to assess preferential areas in the tank (Bratland et al., 2010; Folkedal et al., 2012a, 2012b; Stien et al., 2007). However to our knowledge, only three studies have been based on this approach to study global swimming behaviour like swimming activity or dispersion of the shoal (Duarte et al., 2011; Israeli and Kimmel, 1996; Xu et al., 2006). Xu et al. and Duarte et al. focused on fish activity by subtracting two consecutives frames. Israeli and Kimmel created a group dispersion measure of a shoal without recognition of individual fish (Israeli and Kimmel, 1996). All these studies were however tested either on a low density fish shoal or on flat fish limiting fish overlapping. In this context, our work, inspired by Israeli and Kimmel's and Xu's, focused on the development of an automatic, simple, non-invasive and economic method to monitor shoaling and swimming behaviour of free swimming fish in aquaculture conditions without any practical upper limit of density or number. The objective of the present study was to develop a computerized method extracting an index of dispersion of a rainbow trout shoal and an index

of its swimming activity. Reliability of the method was verified on computer simulations where fish group behaviours were changed in order to increase swimming activity or group formation. The method was also tested on two real sets of observations using two radically different environmental conditions: (i) food distribution and (ii) confinement. Finally, our results were compared to Israeli's method and clearly showed an improvement in reliability and accuracy with our method.

2. Materials and methods

2.1. Image analysis procedure

An algorithm was developed with the free software ImageJ 1.47b (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and automated with a macro, precisely described below. This algorithm was designed to automatically treat and analyse several images extracted from videos taken from above the aquaria or tanks, each step is detailed below. The only condition of use is to have images where fish colour is different from the colour of the bottom of the tank. First, the macro will ask the user to identify the position in the images of every aquarium to analyse. It will then ask him to set the threshold from which fish are different from the background, and finally, the user will be asked to give the minimum size of a fish. The algorithm will then use these settings to treat images in order to get fish in black pixels on a white background and then calculate two indexes of group behaviour. The different steps of treatment and analysis of the macro are more precisely described below.

First, images are transformed into 8-bit images (grey colours) and are smoothed using a median followed by a Gaussian filter. If fish are lighter than background, images are inverted. A background picture is created by selecting for each pixel its maximum value out of 30 images taken in the whole sequence. All images are then divided by the background image and pixel values are multiplied by 255 (maximum value in a 8-bit picture). A threshold is then applied to each image and images are binarized so that background becomes white and fish black. The macro keeps then only groups of black pixels having an area bigger than a fish size. Finally, out of these transformed images, four fish shoal behaviour indexes, detailed below, are calculated. The effect of these steps is shown in Figure 14. The macro creates a text file containing all the results. This text file is analysed using the free software R 2.14.0 (<http://cran.r-project.org/>).

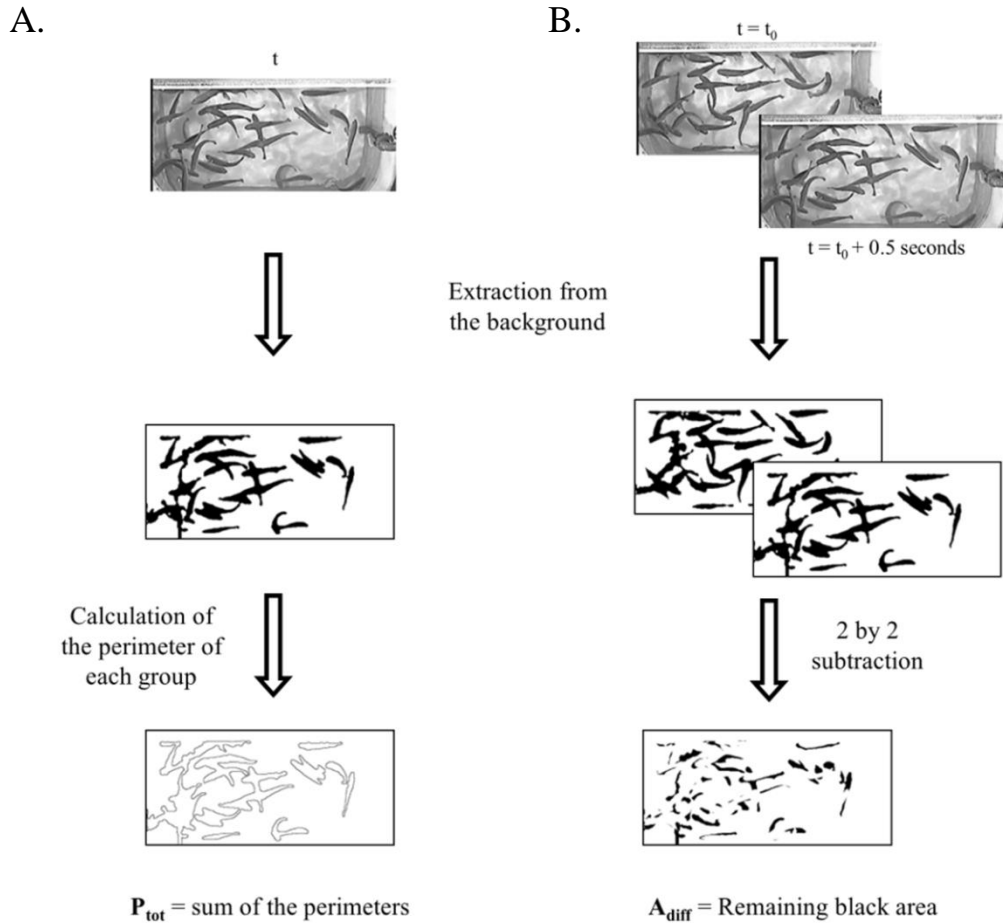


Figure 14. Calculation of group behaviour index from images extracted from a video taken from the top of a tank.

(A) Estimation of the group dispersion: sum of the perimeters of each group of fish (P_{tot}) and (B) estimation of the swimming activity of a group of fish: subtraction of an image by the former and measure of the remaining black area (A_{diff}).

- Fish group dispersion index

This first index was designed to give an indication on the dispersion of the group in the tank or the aquarium. The index was calculated by summing the perimeters of each group of individuals (Figure 14A). A group is a single black area created by the outlines of overlapping fish. A group may consist of one fish only. Using this technique, we expected that index would be high when shoal is spread and low when it is aggregated.

$$P_{tot} = \sum_{i=1}^n P_i$$

Where n is the total number of groups in the picture and P_i is the perimeter of a given group of individuals for image t .

- Fish group activity index

For each image, an index of swimming activity (Figure 14B) is estimated by subtracting from an image any dark areas that overlap with dark areas in the previous image in a chronological order. The remaining area is proportional to the fish movement in a given time interval and gives therefore a good estimation of the swimming activity of the shoal. When swimming activity is important, we expected therefore a high index.

$$A_{diff} = ((A_{t+dt} + A_t) / A_{tot}) / dt$$

Where A_t corresponds to the projected area of all fish for a given image t . To avoid bias linked to the size of the fish in the tank, fish group activity index was normalized by the total dark area in an image where fish are not overlapping. Results are then divided by the time interval (dt) between the two images. This final index noted A_{diff} translates therefore a percentage of movement of the shoal per time.

- Israeli's method

Indexes of fish group behaviour were developed by Israeli and Kimmel (Israeli and Kimmel, 1996) with the coordinates of centre of gravity of the fish groups on the X and Y axis. The standard deviation of the different centres of gravity on both axis is calculated and can be interpreted as the dispersion of the shoal for image t .

$$\text{On the X axis: } SDX_t = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n A_i (X_i - CX_t)^2}{\sum_{i=1}^n A_i}}$$

Where A_i corresponds to the area of a group of fish, X_i denotes the X coordinate of its centre of gravity and CX is the mean of centres of gravity of all groups weighted by their area.

$$\text{On the X axis: } CX_t = \frac{\sum_{i=1}^n A_i X_i}{\sum_{i=1}^n A_i}$$

By replacing X by Y in the last two equations, the SDY index is also calculated.

2.2 Validation of the indexes on computerized group behaviour simulation

Reliabilities of the two indexes needed first to be validated. Therefore, the two measures were tested on computerized fish group behaviour simulations where group cohesion and

swimming speed were controlled. These simulations allowed us to know exact positions and movements of each fish in the aquarium and to calculate true values of dispersion and swimming speed of the group.

For these validations, a second ImageJ macro was developed to create 400 successive images representing movements over time of 30 fish, depicted by 30 equal ellipses in a virtual aquarium considered as a rectangle having 8x4x3 fish body length (FBL) dimensions. The minor axis of each ellipse was 0.2 FBL. These settings were chosen to be close to our experimental conditions. Simulated fish were first randomly introduced in the virtual aquarium and their movements were governed by three rules following Reynold's model on flocks, herds and schools (Reynolds, 1987):

- Cohesion: fish steer to move toward the centre of gravity of the group. The corresponding movement for the fish i at time t is dependent of the previous situation ($t-1$) and is calculated by the expression:

$$\vec{V1}_i(t) = CG(t-1) - position_i(t-1)$$

With CG the centre of gravity of all fish except fish i , and $position_i$ the position of the centre of the ellipse representing fish i .

- Separation: fish steer to separate from close neighbours.

$$\vec{V2}_i(t) = -\sum_{l=1}^L (position_l(t-1) - position_i(t-1))$$

Where $position_l$ is the position of a fish closer than 0.6 FBL to fish i . The limit of 0.6 FBL was chosen to authorize close parallel swimming (0.2 FBL between fish).

- Alignment: fish steer to swim in the same direction. The movement of fish i is therefore equivalent to the mean movement of all other fish in the former situation:

$$\vec{V3}_i(t) = \vec{V}_m(t-1)$$

Where \vec{V}_m is the mean of the movement of all fish except fish i .

The movement of the fish i for time t $\vec{V}_i(t)$ is therefore equivalent to a weighted sum of its former movement and the three vectors described above and is calculated by the formula:

$$\vec{V}_i(t) = a \times \vec{V}_i(t-1) + b \times \vec{V1}_i(t) + c \times \vec{V2}_i(t) + d \times \vec{V3}_i(t)$$

Where a , b , c and d are the weights of each rule.

The movement $\vec{V}_i(t)$ is limited to a swimming speed limit v_{lim} , if $\|\vec{V}_i(t)\| > v_{lim}$, then:

$$\vec{V}_i(t) = \frac{\vec{V}_i(t)}{\|\vec{V}_i(t)\|} \times v_{lim}$$

Finally, new position of fish i on image t is determined by its former position plus its vector movement:

$$position_i(t) = position_i(t-1) + \vec{V}_i(t)$$

2.2.1. Simulation with variation of the weight of the cohesion rule

This first simulation consisted in changing the weight b and keeping a , c , d and v_{lim} constant. The weight b was initially set to 0, and was increased in 3 steps occurring after the 50th, the 100th and the 150th image. It was then decreased symmetrically after the 250th, the 300th and the 350th image to come back to 0.

Since, initial positions of the fish were randomly chosen, repetitions of a same simulation can slightly differ. The simulation was therefore reproduced in 4 replicates.

2.2.2. Simulation with variation of the swimming speed limit

This second simulation consisted in changing v_{lim} and keeping a , b , c and d constant. The weight b was set for this simulation to 0 and v_{lim} was increased in 3 steps occurring after the 100th, the 150th and the 200th image. It was then decreased symmetrically after the 300th, the 350th and the 400th image to come back to the initial v_{lim} .

As for the precedent simulation, this simulation was reproduced in 4 replicates.

Reliability of the indexes

Images created by the simulations were analysed using the procedure described in 2.1 and compared with true values of dispersion and swimming speed. Indeed, since the positions of all fish (ellipses) are known for image t , the true value of the group dispersion is given by the mean distance between all fish:

$$\text{True mean distance between fish (t)} = \frac{\sum_{i=1}^N \sqrt{(position_i(t) - CG(t))^2}}{N}$$

Where CG is the centre of gravity of the whole group, and N the number of fish in the group.

Similarly, the true mean velocity of the fish can be calculated using the formula:

$$\text{True mean velocity of the fish (t)} = \frac{\sum_{i=1}^N \|\vec{V}_i(t)\|}{N}$$

2.3 Application on two case studies

The group behaviour measures were then tested on real experimental conditions in two case studies. Digital cameras were installed above experimental aquaria to observe fish from the top. Aquaria had a light background, were cover free and well lit. Videos were stored before analysis in mpeg2 format. For each video, two frames per second were extracted using the free software VirtualDub 1.9.11 (image samples of the two case studies in appendix 1). The number of frames per second determines the precision of future measures. However, this number is also dependent on technical limits (volume of data and time of analysis).

For these two case studies, the macro automatically analysed 172800 images and produced an output of more than 860000 values in 58 hours with a Personal Computer Intel Pentium 2.40 GHz, 1Go RAM.

2.3.1. Case study 1

Rainbow trout were reared in our freshwater INRA experimental fish farm (PEIMA, Sizun, France). Rearing conditions were chosen to be close to commercial conditions. Fish were maintained under natural photoperiods and were fed ad libitum with an experimental marine diet containing fish meal and fish oil in high proportions. For more details on the diet, see “diet M” in the article from Le Boucher et al. (Le Boucher et al., 2012). After eight months,

eight replicate tanks (100*50*30 cm) of 150 L were each populated with 40 trout. The fish mean weight per tank was 73.4 g (± 1.4 g). Stocking density was therefore around 20 kg/m³. Fish were fed at a fixed point of the aquarium at 11:00 and 16:30 by Arvotec feeders manually remote-controlled. After two weeks of acclimation, behaviour in the 8 tanks was recorded 5 minutes before and 5 minutes after the first meal distribution.

2.3.2. Case study 2

Rainbow trouts were reared in our experimental facilities (INRA, Rennes, France). Rearing conditions were chosen to be close to commercial conditions. Fish were maintained under natural photoperiods and were fed ad libitum with a commercial diet. Nine weeks after first feeding, four replicate aquaria (18*12*7 cm) of 1.5L were populated with 18 juveniles. The fish mean weight per tank was 2.93 g (± 0.2 g). Four aquaria were used. Stocking density was around 35 kg/m³. After 2 weeks of acclimation, video of fish was recorded during 1 hour and 20 minutes. At the end of this period, fish were confined in a landing net placed inside the aquarium. Thus, the density was increased to 200kg/m³. After 4 hours of confinement, the fish were released in the aquarium and a video was recorded during 2 hours.

2.4 Data analysis

All graphics in the paper represent mean values per time point.

2.4.1. Simulation analysis

Reliability of the indexes was assessed by the percentage of the total variation of true values that they explained (R^2) using the following simple linear regression models:

$$\text{Distance to CG} = \mu + \alpha \times P_{\text{tot}} + \varepsilon$$

$$\text{Swimming Speed} = \mu + \alpha \times A_{\text{diff}} + \varepsilon$$

$$\text{Distance to CG} = \mu + \alpha \times \text{SDX} + \varepsilon.$$

The expectation for a reliable index was that the R^2 of the regression was above 90%. Detailed results for all models were given in appendix 2.

2.4.2. Cases analysis

Results were summarized by calculating the mean for each index and aquaria per 30 seconds for the feeding behaviour case and 10 minutes for the confinement case. These durations were

chosen to obtain 20 time periods in each experiment, enabling the comparison between periods, while preserving clarity of the results.

Results were analysed using a linear model accounting for variability in index values according to aquarium and time periods (both qualitative variables) :

$$P_{tot_{ij}} = \mu + \text{Aquarium}_i + \text{Time period}_j + \varepsilon_{ij}$$

$$A_{diff_{ij}} = \mu + \text{Aquarium}_i + \text{Time period}_j + \varepsilon_{ij}$$

Where $P_{tot_{ij}}$ and $A_{diff_{ij}}$ are defined as the index values of Aquarium_i at Time period_j and ε_{ij} the associated residual.

A post-hoc Tukey-HSD test was then performed to compare periods two-by-two.

The analyses were executed using the free software R 2.14.0 (<http://cran.r-project.org/>).

3. Results

By simulating group behaviour in an aquarium, exact values of swimming speed and distance to centre of gravity could be calculated for each fish. The mean of these values for the aquarium were compared to the two group behaviour indexes (A_{diff} and P_{tot}) measured by the presented method. The first simulation (Figure 15) consisted in changing group cohesion in the aquarium. The P_{tot} index translating group dispersion was found to be very sensitive to all these simulated changes in group cohesion. Furthermore its values closely followed the mean distance to centre of gravity (Figure 15). Thus, 96% of total variation in mean distance to centre of gravity was explained by the P_{tot} index in a simple linear regression model.

The second simulation consisted in changing swimming speed limit of each fish (Figure 16). Similarly to P_{tot} , the index A_{diff} translating swimming activity was very sensitive to each change in swimming speed. Its values closely fitted swimming speed values (Figure 16). Thus, 94% of total variation of swimming speed values was explained by the A_{diff} values.

Therefore, P_{tot} and A_{diff} indexes respectively translate reliably dispersion and swimming speed of a simulated fish shoal.

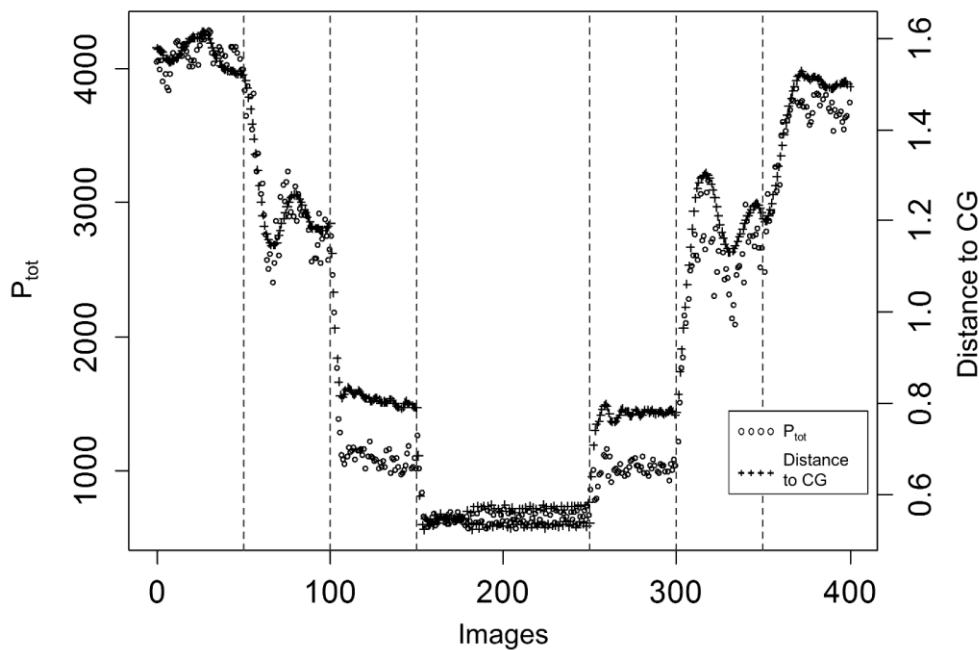


Figure 15. Comparison of the dispersion index (P_{tot}) and the distance between individuals in a group behaviour simulation, where the cohesion of the group varies.

After the 50th, the 100th, and the 150th image, group cohesion is increased and after the 250th, the 300th, and the 350th image, cohesion is decreased. Each change in cohesion is represented by a dashed vertical line.

The open circles represent P_{tot} value for each image of the simulation. The crosses represent the mean of the distance of fish to the centre of gravity (CG) of the group for each image of the simulation. The distance is calculated in Fish Body Length (FBL). Values are expressed as means of four simulations.

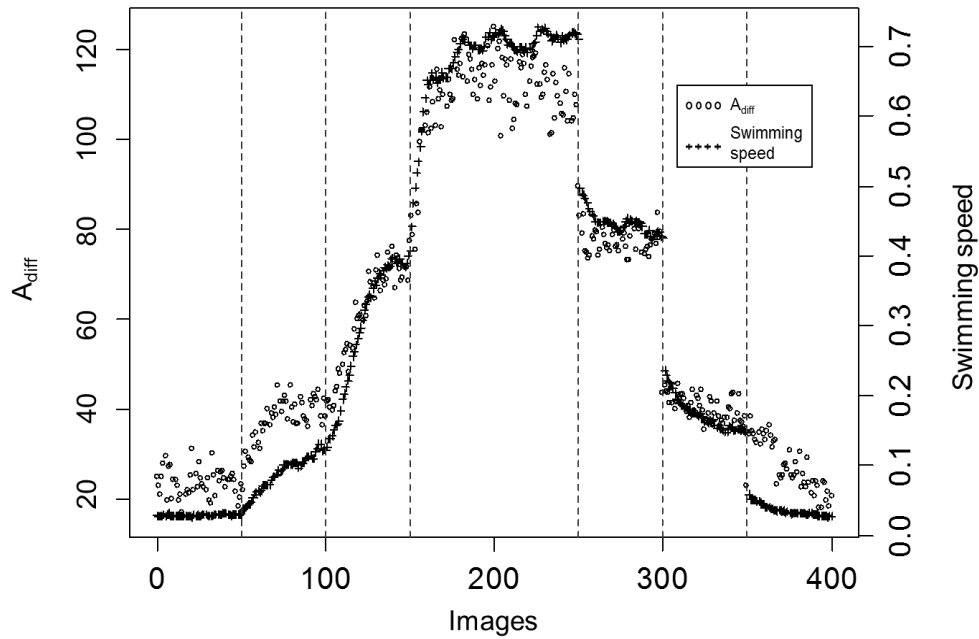


Figure 16. Comparison of the swimming activity index (A_{diff}) and the mean of the swimming speed of each individual in a group behaviour simulation, where swimming speed limit of individuals varies.

After the 50th, the 100th, and the 150th image, swimming speed limit is increased and after the 250th, the 300th, and the 350th image, swimming speed limit is decreased. Each change in swimming speed limit is represented by a dashed vertical line.

The open circles represent A_{diff} value for each image of the simulation. The crosses represent the mean of the swimming speed of simulated fish in the aquarium for each image of the simulation. The velocity is calculated in Fish Body Length (FBL) per frame interval. Swimming activity index is calculated in percentage of shoal movement per frame interval. Values are expressed as means of four simulations.

Indexes SDX and SDY were measured in simulation 1 (the same as used in Figure 15) using Israeli's method (Israeli and Kimmel, 1996). SDX was found to be unable track all changes in group cohesion (Figure 17). Indeed, when the mean distance to the centre of gravity is lower than 0.8 FBL, Israeli's method gives a null result. Thus, only 82% of total variation of the mean distance to the centre of gravity was explained by SDX in a simple linear regression model. Exactly the same results were found using SDY (data not shown).

In a similar manner, in real conditions, SDX or SDY could not be calculated when the shoal formed a single group (Figure 18). Indeed, in images Figure 18a and Figure 18c, Israeli's method was not able to give a correct group dispersion index since fish form one single group in the aquarium. On the contrary, the presented index P_{tot} did not encounter this problem. Furthermore, index P_{tot} was found to be non-significantly affected by the loner fish out of the group in image Figure 18b, with only a slight index increase compared to image Figure 18a, whereas SDX and SDY index gave radically different results between the two images.

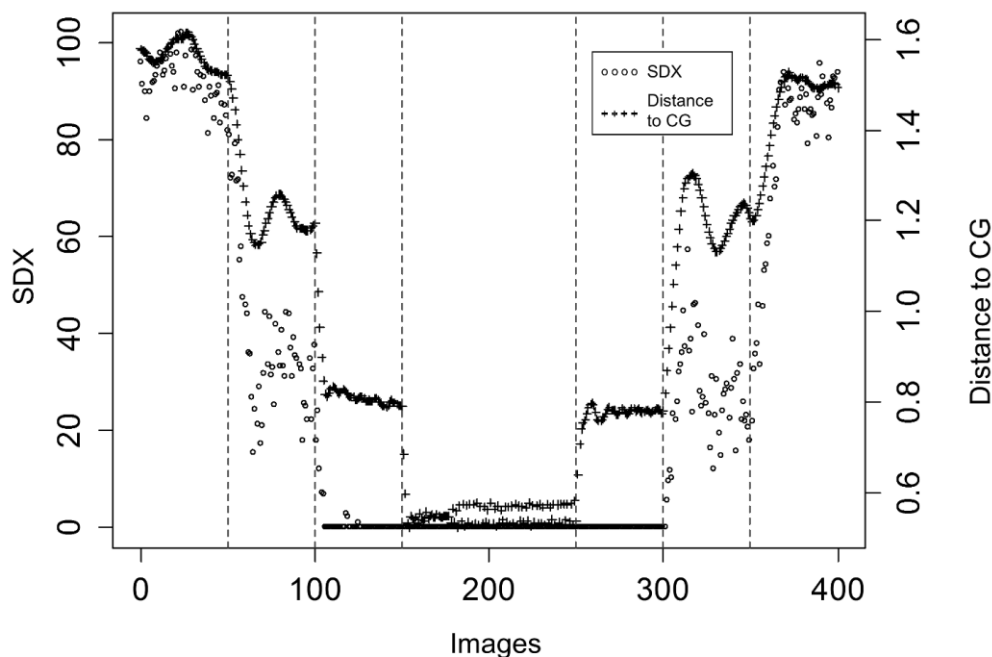


Figure 17. Comparison of Israeli's index SDX and the distance between individuals in a group behaviour simulation, where the cohesion of the group varies.

After the 50th, the 100th, and the 150th image, group cohesion is increased and after the 250th, the 300th, and the 350th image cohesion is decreased. Each change in cohesion is represented by a dashed vertical line.

The open circles represent SDX value for each image of the simulation. The crosses represent the mean of the distance of simulated fish to the centre of gravity (CG) of the group for each image of the simulation. The distance is calculated in Fish Body Length (FBL).

Values are expressed as means of four simulations.

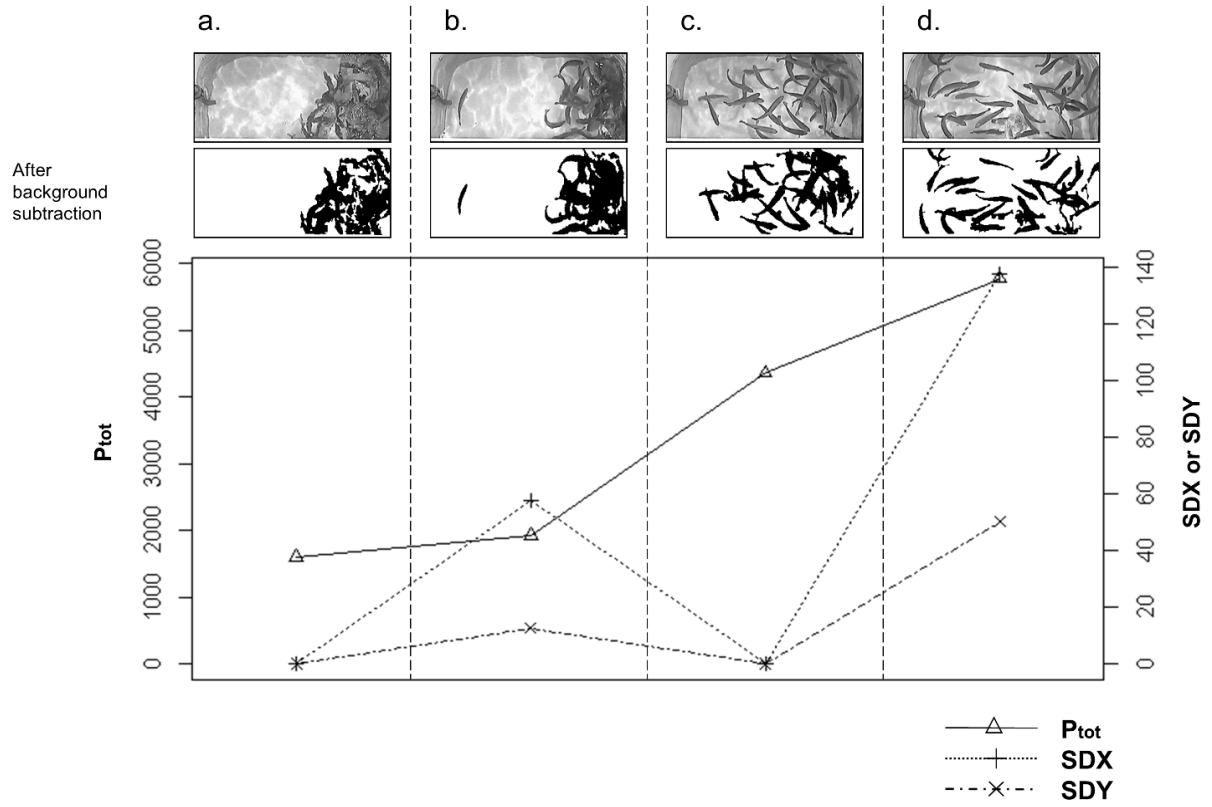


Figure 18. Comparison of three indexes translating fish group dispersion: P_{tot} , SDX and SDY in 4 images.

P_{tot} , proposed in the present study, is calculated by summing all the group perimeters; SDX and SDY are calculated using Israeli's method (Details of these indexes are given in the methods section).

The proposed group behaviour indexes were then tested on two case studies. The presented method produces two data per index every second for each aquarium, creating an almost continuous temporal pattern (appendix 3). To enable statistical analysis, data were grouped and averaged by time sections of 30 seconds or 10 minutes for case studies 1 and 2 respectively. Statistical analyses (Table 3) show, for both indexes, a significant effect of aquaria and time period. These results indicate that all aquaria show specific group behaviour characteristics and that at least one time point is significantly different from the other. Mean temporal patterns are presented with standard errors in Figure 19 and Figure 20, and corresponding time points are statistically compared in Table 4. The two behavioural parameters were globally stable over time prior to the planned environmental perturbation (Table 4), which was meal distribution for study 1, and confinement stress for study 2. In both examples, food distribution and confinement stress had a significant impact on the two behavioural parameters. Indeed, some time points after the perturbation were always significantly different from all time points prior to the perturbation (Table 4).

Table 3. Factors significativity results from linear models estimating effects of aquarium and time periods on the two behavioural indexes P_{tot} and A_{diff} in two case studies.

The symbol *** corresponds to a p-value below 0,001.

	Factors	Index	
		Dispersion	Swimming activity
Case Study 1 : food distribution	Time period	***	***
	Aquarium	***	***
Case Study 2 : confinement challenge	Time period	***	***
	Aquarium	***	***

In study 1, after food distribution, the P_{tot} index dramatically decreased, indicating a sudden aggregation of the fish group (Figure 19A). In parallel, the A_{diff} index increased translating a sudden increase in the swimming activity of the fish (Figure 19B). These results were consistent with our visual observations: globally we could observe, as expected, a strong group formation after food distribution correlated with an increase of swimming speed of the fish. In study 2, confinement stress strongly increased the two indexes (Figure 20). Thus, after confinement, the groups reacted with a greater dispersion, and a higher swimming activity. This was consistent with our visual observations where we observed a high dispersion of the fish in the aquarium after confinement stress correlated with a high swimming speed.

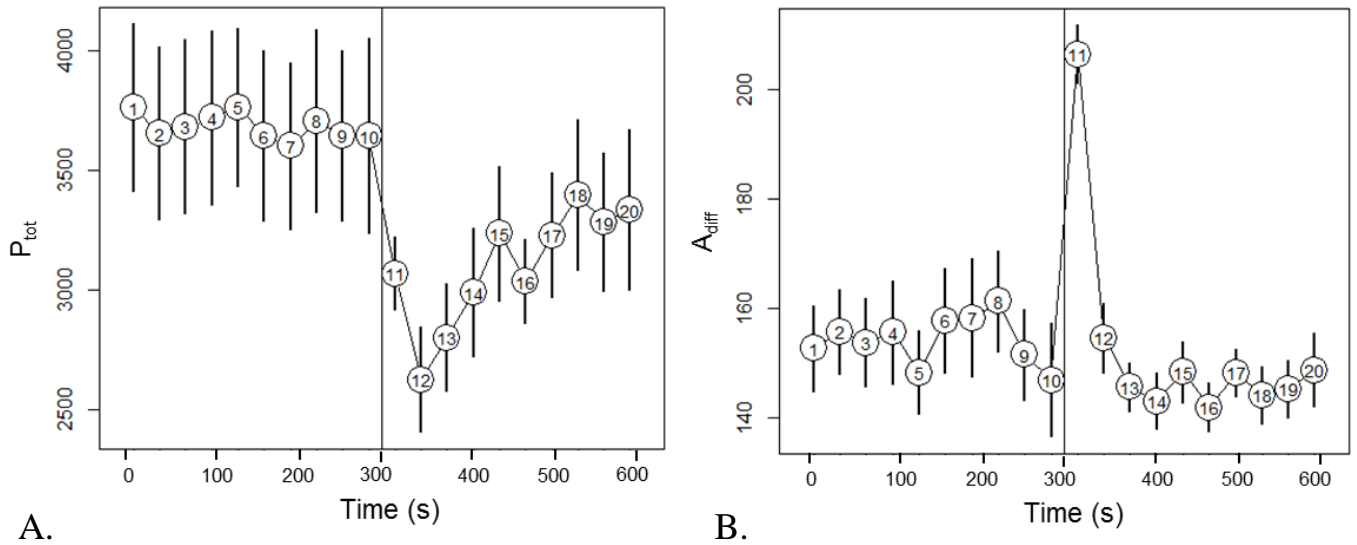


Figure 19. Mean and standard error of group dispersion (P_{tot}) (A) and of group swimming activity (A_{diff}) (B) over time, before and after food distribution (vertical line at 300 s) in 8 aquaria.

Video was recorded 5 minutes before and 5 minutes after food distribution. Swimming activity index is calculated in percentage of shoal movement per second. The dispersion index is a relative index. White discs represent the mean of values at -10 to +10 seconds around the disc. Discs were compared two by two in Table 4.

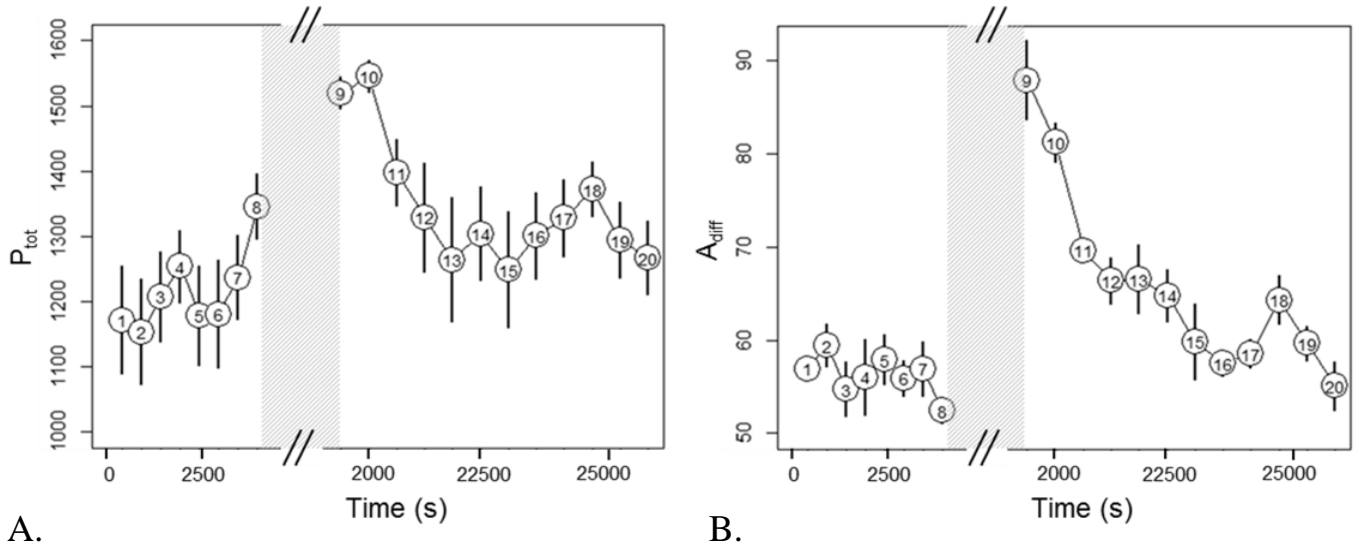


Figure 20. Mean and standard error of group dispersion (P_{tot}) (A) and of group swimming activity (A_{diff}) (B) over time, before and after a confinement (shaded rectangle) in 4 aquaria. Confinement consisted in placing all fish in a landing net inside the aquarium for 4 hours.

Videos were recorded during 1 hour and 20 minutes before the confinement and 2 hours after. Swimming activity index is calculated in percentage of shoal movement per second. The dispersion index is a relative index. White discs represent the mean of values at -10 to +10 seconds around the disc. Discs were compared two by two in Table 4.

Table 4. Comparison of the 20 time points of the temporal pattern for the two behavioural indexes (P_{tot} and A_{diff}) in the two case studies.
Time points having at least one identical letter are not significantly different by the Tukey test ($P<0.05$). Time point's numbers refer to the number displayed in figure 6 and 7.

Case study 1 : Food distribution	Distribution																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
P_{tot}	a	a	a	a	a	a	ab	a	a	a	abc	c	bc	abc	abc	abc	abc	abc	abc	abc
A_{diff}	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b

Case study 2 : Confinement challenge	Confinement										Food									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
P_{tot}	fg	g	defg	cdefg	efg	efg	cdefg	cde	ab	a	abc	cdef	cdefg	cdefg	cdefg	cdefg	cdef	bcd	cdefg	cdefg
A_{diff}	defg	cdefg	fg	efg	cdefg	efg	defg	g	a	a	b	bcd	bc	bcde	cdefg	cdefg	cdefg	bcdef	cdefg	fg

4. Discussion

This study shows that some behavioural parameters such as group dispersion and swimming activity, which are relevant stress indicators (Martins et al., 2012; Scherer, 1992), can be precisely estimated from the perimeter and the area of group of fish in an aquarium. The measured parameters were found to reliably translate controlled artificial group behaviour modifications in computerized simulations. Indeed, the use of fish group simulation enabled us to recreate the behaviour of a shoal in an aquarium where fish positions were perfectly known. This provided true reference values of dispersion and swimming speed of the group. This validation process consisted in artificially increasing step by step cohesion or swimming speed of the group and to compare the reference values of dispersion and swimming speed with the estimated ones, calculated using the present method. The parameters measured using the present macro were found to be very close to exact values and are therefore reliable indicators of fish shoal behaviour.

The present method, like Israeli's, translates a 3D behavior in an index calculated in a 2D environment (pictures). Therefore, our method is not able to pick up any variations in the depth plane. This characteristic surely creates deviations between the indexes and the real behaviour, when depth becomes important. To evaluate this error, the tool was validated on simulations created in a 3D environment. These simulations permit virtual fish to evolve in all the dimensions of the virtual tank, and allow consequently, the evaluation of the deviations between exact behaviour values and indexes calculated from the present method. Estimated behaviours, calculated using the present method, were found to explain more than 94% of the total variability of the exact behaviour values (see Figure 15 and Figure 16). Therefore, less than 6% of the total variability were not detected by the present method. This error is probably mainly due to the missing dimension in the present method, but remains very low.

Furthermore, these parameters could be estimated in different real conditions and responded sensitively to two different events: food distribution and confinement stress. Indeed, the present method highlighted an expected grouping phenomenon right after food distribution and was able to measure the corresponding sudden increase of swimming speed. The recovery curve could be precisely followed. These two indexes are interesting parameters translating feeding motivation in foraging behaviour studies (Ashley, 2007; Martins et al., 2009, 2011). They might, for instance, be relevant indexes in future studies examining the effect of diet composition on food intake behaviour (Geurden et al., 2005, 2007). Likewise, this new tool

showed that behavioural parameters are affected by confinement stress. Dispersion of the shoal and swimming activity were higher after the stress and needed almost two hours to come back to their initial state. This study is the first showing a short-term effect of a confinement stress on the behaviour of a fish shoal. Consequently, this work describes for the first time the behavioural recovery curve after confinement stress. These recovery parameters are important features for studies investigating adaptive capacities of fish following environmental or human challenges.

To our knowledge, only Stien et al. (Stien et al., 2007) and Israeli and Kimmel (Israeli and Kimmel, 1996) created similar global fish shoal dispersion indexes, on salmon and goldfish respectively. These indexes are also economic and non invasive behaviour measures. However, the method of Stien et al. focused only on the vertical distribution of the fish shoal creating a one-dimensional measure. The present dispersion measure based on the sum of the perimeters of the groups takes into account variations in a two-dimensional environment, although not the vertical distribution. The method of Israeli and Kimmel is based on the calculation of the mean and standard deviation of the centre of gravity of all fish but this method is altered when fish are overlapping on the image. Thus, when fish form one large group, only one centre of gravity exists and standard deviation of the centre of gravity is therefore null independently of shoal dispersion (Figure 18a and Figure 18c). In contrast, the present index of dispersion varies regardless of fish overlapping. Furthermore, Israeli's method is strongly impacted by a lone fish out of the group even if, globally the group is not much dispersed (Figure 18a and Figure 18b). The present method does not face such difficulty and show a group dispersion index (P_{tot}) that is similar to the previous value (CV of 4,5%). The present method is therefore much more appropriate to high stocking densities than Israeli's. Our method reaches its limitations only at extremely high densities where fish covers frequently the total area of the tank. However, in those conditions, the group cannot really express group behaviour since it misses movement possibilities.

Further, this method using image analysis from video allows the dynamic pattern of behaviour to be characterized in an automated procedure. In these examples, the analysis was run on two images per second but the frequency of measures can be highly increased without any supplemental difficulties; the only limitation is that of the capture rate of the camera. The ability to easily access the dynamic pattern of behaviour will greatly facilitate studies on the environmental factors affecting fish behaviour in aquacultural conditions, and the capacities of fish to cope with such challenges. Such data permit for example smoothing methods to

identify disturbances in behaviour (Codrea et al., 2011), or allow comparison with mathematical models (Viscido et al., 2004). However, these measurements focus only on group behaviour and put therefore aside the differences between individuals inside a same aquarium.

Our group behaviour measures method can be applied on several aquaria for long periods of time almost continuously. It becomes therefore conceivable to adapt the system to create a reliable qualitative system of surveillance in aquaculture. Indeed, future work is envisaged to enable this method to give instantaneous measures of the behaviour in aquacultural conditions. The principal limits reside in filming conditions which need to be realized in relatively high luminosity and, of course on cover free aquaria.

In conclusion, this behavioural analysis system could be applied to quantify differences in behaviour associated with exposure to chemical compounds, physical challenges, microbial invasion, predator intrusion, dominant situation, food privation etc. These parameters also provide a potential tool for modelling the dynamic of behavioural states over time. Finally, this method provides a sensitive, non-invasive, simple and widely applicable tool to assess behavioural changes associated with various challenges.

References

- Almazán-Rueda, P., Van Helmond, A.T.M., Verreth, J. a. J., Schrama, J.W., 2005. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology* 67, 1029–1039. doi:10.1111/j.0022-1112.2005.00806.x
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104, 199–235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001
- Atchison, G.J., Henry, M.G., Sandheinrich, M.B., 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environ Biol Fish* 18, 11–25. doi:10.1007/BF00002324
- Barry, M.J., 2012. Application of a novel open-source program for measuring the effects of toxicants on the swimming behavior of large groups of unmarked fish. *Chemosphere* 86, 938–944. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.011
- Bégout Anras, M.-L., Lagardère, J.P., 2004. Measuring cultured fish swimming behaviour: first results on rainbow trout using acoustic telemetry in tanks. *Aquaculture* 240, 175–186. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.02.019
- Bratland, S., Stien, L.H., Braithwaite, V.A., Juell, J.-E., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Fosseidengen, J.E., Kristiansen, T.S., 2010. From fright to anticipation: using aversive

- light stimuli to investigate reward conditioning in large groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult Int* 18, 991–1001. doi:10.1007/s10499-009-9317-8
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339, 814–815. doi:10.1126/science.1226850
- Butail, S., Paley, D.A., 2012. Three-dimensional reconstruction of the fast-start swimming kinematics of densely schooling fish. *J. R. Soc. Interface* 9, 77–88. doi:10.1098/rsif.2011.0113
- Codrea, M.C., Højsgaard, S., Friggens, N.C., 2011. Differential smoothing of time-series measurements to identify disturbances in performance and quantify animal response characteristics: An example using milk yield profiles in dairy cows. *J ANIM SCI* 89, 3089–3098. doi:10.2527/jas.2010-3753
- Colléter, M., Brown, C., 2011. Personality traits predict hierarchy rank in male rainbowfish social groups. *Animal Behaviour* 81, 1231–1237. doi:10.1016/j.anbehav.2011.03.011
- Conti, S.G., Roux, P., Fauvel, C., Maurer, B.D., Demer, D.A., 2006. Acoustical monitoring of fish density, behavior, and growth rate in a tank. *Aquaculture* 251, 314–323. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.06.018
- Delcourt, J., Becco, C., Vandewalle, N., Poncin, P., 2009. A video multitasking system for quantification of individual behavior in a large fish shoal: Advantages and limits. *Behavior Research Methods* 41, 228–235. doi:10.3758/BRM.41.1.228
- Doupé, R.G., Partridge, G.J., Lymbery, A.J., 2003. Visible implant fluorescent elastomer tags as pedigree markers for applied aquaculture: an evaluation using black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Aquaculture Research* 34, 681–683. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00860.x
- Dror, M., Sinyakov, M.S., Okun, E., Dym, M., Sredni, B., Avtalion, R.R., 2006. Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109, 279–287. doi:10.1016/j.vetimm.2005.08.022
- Duarte, S., Reig, L., Masalo, I., Blanco, M., Oca, J., 2011. Influence of tank geometry and flow pattern in fish distribution. *Aquacultural Engineering* 44, 48–54. doi:10.1016/j.aquaeng.2010.12.002
- Espmark, Å.M., Baeverfjord, G., 2009. Effects of hyperoxia on behavioural and physiological variables in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquacult Int* 17, 341–353. doi:10.1007/s10499-008-9206-6
- Faucher, K., Parmentier, E., Becco, C., Vandewalle, N., Vandewalle, P., 2010. Fish lateral system is required for accurate control of shoaling behaviour. *Animal Behaviour* 79, 679–687. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.12.020

- Folkedal, O., Stien, L.H., Torgersen, T., Oppedal, F., Olsen, R.E., Fosseidengen, J.E., Braithwaite, V.A., Kristiansen, T.S., 2012a. Food anticipatory behaviour as an indicator of stress response and recovery in Atlantic salmon post-smolt after exposure to acute temperature fluctuation. *Physiology & Behavior* 105, 350–356. doi:10.1016/j.physbeh.2011.08.008
- Folkedal, O., Torgersen, T., Olsen, R.E., Fernö, A., Nilsson, J., Oppedal, F., Stien, L.H., Kristiansen, T.S., Fernö, A., 2012b. Duration of effects of acute environmental changes on food anticipatory behaviour, feed intake, oxygen consumption, and cortisol release in Atlantic salmon parr. *Physiology & Behavior* 105, 283–291. doi:10.1016/j.physbeh.2011.07.015
- Geffroy, B., Bardonnnet, A., 2012. Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance. *Ecology of Freshwater Fish* 21, 469–482. doi:10.1111/j.1600-0633.2012.00566.x
- Geurden, I., Corraze, G., Boujard, T., 2007. Self-feeding behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, offered diets with distinct feed oils. *Applied Animal Behaviour Science* 108, 313–326. doi:10.1016/j.applanim.2006.12.006
- Geurden, I., Cuvier, A., Gondouin, E., Olsen, R.E., Ruohonen, K., Kaushik, S., Boujard, T., 2005. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology & Behavior* 85, 107–114. doi:10.1016/j.physbeh.2005.03.010
- Hasler, C.T., Suski, C.D., Hanson, K.C., Cooke, S.J., Philipp, D.P., Tufts, B.L., 2009. Effect of water temperature on laboratory swimming performance and natural activity levels of adult largemouth bass. *Canadian Journal of Zoology* 87, 589–596.
- Hoare, D., Couzin, I., Godin, Krause, J., 2004. Context-dependent group size choice in fish. *Animal Behaviour* 67, 155–164. doi:10.1016/j.anbehav.2003.04.004
- Huntingford, F., Jobling, M., Kadri, S., 2011. *Aquaculture and Behavior*. John Wiley & Sons.
- Israeli, D., Kimmel, E., 1996. Monitoring the behavior of hypoxia-stressed *Carassius auratus* using computer vision. *Aquacultural Engineering* 15, 423–440. doi:10.1016/S0144-8609(96)01009-6
- Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B., 1997. *Fish stress and health in aquaculture*.
- Johansson, D., Ruohonen, K., Juell, J.-E., Oppedal, F., 2009. Swimming depth and thermal history of individual Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in production cages under different ambient temperature conditions. *Aquaculture* 290, 296–303. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.022
- Juell, J.-E., Oppedal, F., Boxaspen, K., Taranger, G.L., 2003. Submerged light increases swimming depth and reduces fish density of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in

- production cages. *Aquaculture Research* 34, 469–478. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00833.x
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C.A., Hunter, C., 2004. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Research* 38, 3993–4001. doi:10.1016/j.watres.2004.06.028
- Koltes, K.H., 1985. Effects of Sublethal Copper Concentrations on the Structure and Activity of Atlantic Silverside Schools. *Transactions of the American Fisheries Society* 114, 413–422. doi:10.1577/1548-8659(1985)114<413:EOSCCO>2.0.CO;2
- Kramer, D.L., 1987. Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes* 18, 81–92. doi:10.1007/BF00002597
- Kristiansen, T.S., Fernö, A., Holm, J.C., Privitera, L., Bakke, S., Fosseidengen, J.E., 2004. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture* 230, 137–151. doi:10.1016/S0044-8486(03)00436-8
- Le Boucher, R., Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Ruelle, F., Vergnet, A., Kaushik, S., Allamellou, J.M., Médale, F., Chatain, B., 2012. Genotype by diet interactions in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in case of a nutritional challenge on totally plant-based diets. *J ANIM SCI* jas.2012–5311. doi:10.2527/jas.2012-5311
- Lee, C.G., Farrell, A.P., Lotto, A., MacNutt, M.J., Hinch, S.G., Healey, M.C., 2003. The effect of temperature on swimming performance and oxygen consumption in adult sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon stocks. *J Exp Biol* 206, 3239–3251. doi:10.1242/jeb.00547
- Lima, S.L., Dill, L.M., 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can. J. Zool.* 68, 619–640. doi:10.1139/z90-092
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2011. Stressing fish in Recirculating Aquaculture Systems (RAS): does stress induced in one group of fish affect the feeding motivation of other fish sharing the same RAS? *Aquaculture Research* 42, 1378–1384. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02728.x
- Martins, C.I.M., Galhardo, L., Noble, C., Damsgård, B., Spedicato, M.T., Zupa, W., Beauchaud, M., Kulczykowska, E., Massabuau, J.-C., Carter, T., Planellas, S.R., Kristiansen, T., 2012. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiol Biochem* 38, 17–41. doi:10.1007/s10695-011-9518-8
- Martins, C.I.M., Ochola, D., Ende, S.S.W., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2009. Is growth retardation present in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in low water exchange recirculating aquaculture systems? *Aquaculture* 298, 43–50. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.030

- Oppedal, F., Juell, J.E., Johansson, D., 2007. Thermo- and photoregulatory swimming behaviour of caged Atlantic salmon: Implications for photoperiod management and fish welfare. *Aquaculture* 265, 70–81. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.01.050
- Pankhurst, N.W., Kraak, G. van der, Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B., 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. 73–93.
- Reynolds, C., 1987. Flocks, herds and schools: A distributed behavioral model. Presented at the Proceedings of the 14th annual conference on Computer graphics and interactive techniques, ACM, pp. 25–34. doi:10.1145/37401.37406
- Rosny, J.D., Roux, P., 2001. Multiple scattering in a reflecting cavity: Application to fish counting in a tank. *The Journal of the Acoustical Society of America* 109, 2587–2597. doi:10.1121/1.1369101
- Scherer, E., 1992. Behavioural responses as indicators of environmental alterations: approaches, results, developments. *Journal of Applied Ichthyology* 8, 122–131. doi:10.1111/j.1439-0426.1992.tb00674.x
- Schjolden, J., Backström, T., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., Winberg, S., 2005. Divergence in behavioural responses to stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with contrasting stress responsiveness. *Hormones and Behavior* 48, 537–544. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.04.008
- Stien, L.H., Bratland, S., Austevoll, I., Oppedal, F., Kristiansen, T.S., 2007. A video analysis procedure for assessing vertical fish distribution in aquaculture tanks. *Aquacultural Engineering* 37, 115–124. doi:10.1016/j.aquaeng.2007.03.002
- Viscido, S.V., Parrish, J.K., Grnbaum, D., 2004. Individual behavior and emergent properties of fish schools: a comparison of observation and theory. *Mar Ecol Prog Ser* 273, 239–249. doi:10.3354/meps273239
- Weis, P., Weis, J.S., 1974. Schooling behavior of *Menidia menidia* in the presence of the insecticide Sevin (Carbaryl). *Marine Biology* 28, 261–263. doi:10.1007/BF00388493
- Weis, P., Weis, J.S., 1974. DDT causes changes in activity and schooling behavior in goldfish. *Environmental Research* 7, 68–74. doi:10.1016/0013-9351(74)90076-0
- Welker, T.L., McNulty, S.T., Klesius, P.H., 2007. Effect of Sublethal Hypoxia on the Immune Response and Susceptibility of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, to Enteric Septicemia. *Journal of the World Aquaculture Society* 38, 12–23. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00069.x
- Xu, J., Liu, Y., Cui, S., Miao, X., 2006. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. *Aquacultural Engineering* 35, 207–217. doi:10.1016/j.aquaeng.2006.02.004

2 Les bacs expérimentaux et la distribution d'eau

La méthode d'analyse du comportement des poissons en groupe présentée précédemment ne fonctionne que lorsque les poissons sont différenciables du fond du bac. Il est donc nécessaire que le bac soit bien éclairé et qu'il ne présente pas de couvercle. Nous avons donc choisi de construire des bacs expérimentaux beiges, avec des bords surélevés pour éviter les échappements, et évasés afin d'éviter les ombres (Figure 21).

Ainsi 24 bacs expérimentaux ont été construits. La distribution d'eau se faisait par gravité à l'aide d'une colonne d'eau dont le débit était déterminé par sa hauteur. Avant chaque expérience, les poissons ont été acclimatés à ces bacs expérimentaux pendant deux semaines.

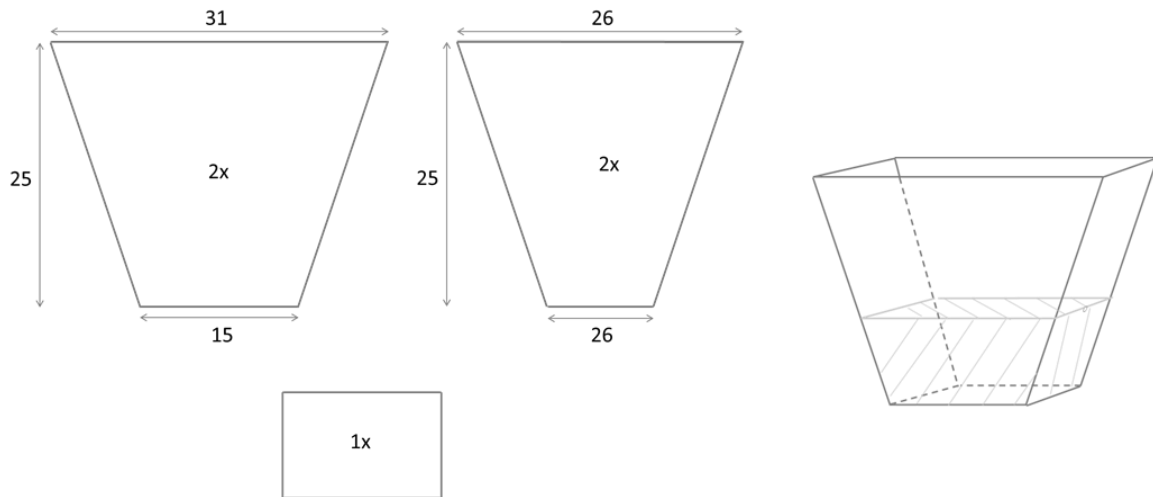


Figure 21. Patron d'un bac expérimental. Réalisé avec des plaques de PVC beige.

Mesure en centimètres.

3 Mesures du cortisol dans l'eau et de la consommation en oxygène

Comme vu précédemment, les caractères non-invasifs et non-intrusifs des prélèvements sont essentiels pour étudier les réponses spontanées des individus avant, pendant et après la perturbation environnementale. Ainsi lorsque les fonctions biologiques d'intérêt le permettaient comme pour le cortisol ou la consommation d'oxygène, nous avons adapté de la littérature des méthodes permettant de les mesurer sans toucher aux poissons ou aux installations. Nous avons ainsi pu mesurer le cortisol rejeté dans l'eau par les poissons et leur consommation en oxygène au cours du temps.

3.1 Cortisol dans l'eau

L'épithélium branchial est une importante interface entre l'eau et l'animal. Cette surface laisse passer de nombreuses molécules plasmatiques, dont le cortisol (Ellis et al., 2005). D'après Ellis et al. (2004), la concentration de cortisol dans l'eau semble corrélée à la concentration plasmatique et permet de mesurer de façon non invasive la réactivité de l'axe HPI. Les quantités de cortisol retrouvées dans l'eau proviennent à plus de 95% de la branchie (Ellis et al., 2005). Un système de prélèvement d'eau utilisant une pompe péristaltique a donc été ajoutée aux bassins. Fonctionnant en continu, ce système prélevait de l'eau d'un côté du bac et la ramenait de l'autre côté, formant un circuit fermé utilisé pour la mesure de la consommation d'oxygène (voir ci-dessous). Au moment du prélèvement d'eau, un robinet permettait d'ouvrir le circuit et de récupérer l'eau. La méthode de mesure du cortisol dans l'eau a été adaptée de la publication d'Ellis et al. (2004). En résumé, l'eau est d'abord filtrée à l'aide d'une pompe péristaltique à travers plusieurs filtres de tailles de pores décroissantes. L'eau est ensuite passée à travers une cartouche d'extraction à phase solide (Sep-Pak plus). Le cortisol fixé par la cartouche est ensuite élué à l'aide d'éthyl acétate cyclohexane (1/1). Le cortisol est ensuite dosé par Radio Immuno Assay (RIA) comme décrit dans la publication de Auperin et al. (1997).

3.2 Consommation en oxygène

La mesure de la consommation d'oxygène est couramment réalisée dans des chambres métaboliques fermées. La technique consiste à arrêter de façon automatique le débit puis de mesurer la pente de décroissance de la concentration en oxygène dans l'eau (McKenzie et al., 1995; Steffensen, 1989).

Dans notre cas, les bacs expérimentaux ont servi de chambres métaboliques ouvertes. Une sonde O₂ (Oxy-4, Presens) était, en effet, placée sur le circuit fermé décrit dans la partie précédente. Afin d'estimer les échanges entre notre système et l'air, nous avons diminué artificiellement la concentration d'oxygène dans l'eau en injectant de l'azote dans 4 bacs (sans poissons) installés en parallèle et nous avons mesuré l'augmentation de la teneur en oxygène de l'eau durant 45 minutes (Figure 22). A t=0, la concentration d'oxygène variait de 20 à environ 50 mg/L selon les bacs. Comme prévu, les bacs avec les valeurs les plus faibles en oxygène à t=0 montrent la plus forte augmentation d'oxygène en 45 minutes. A 50mg/L à t=0, le système ne montre pas d'augmentation de la concentration d'oxygène dans les bacs. Le

système de bac ouvert associé au circuit extérieur d'eau peut donc être considéré comme un système fiable de mesure de la consommation en oxygène par les poissons lorsque la concentration en O₂ dans les bassins reste supérieure à 50mg/L.

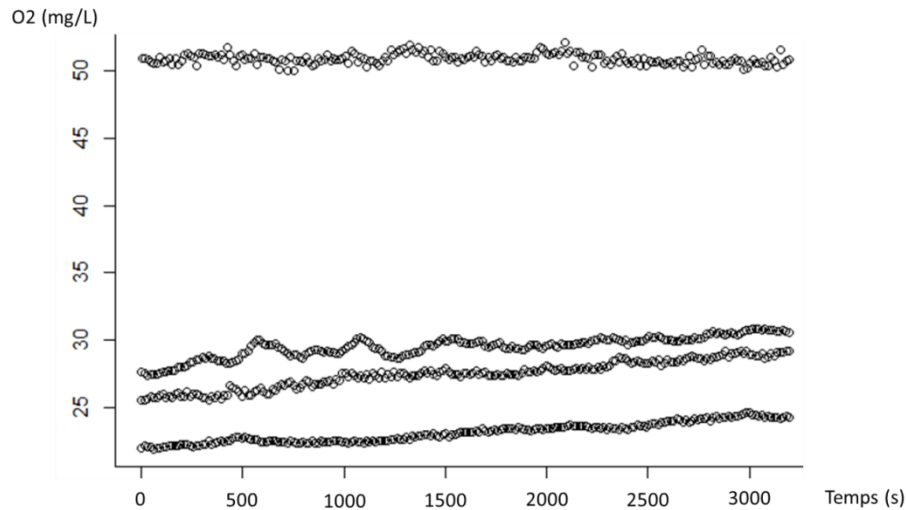


Figure 22. Augmentation de la concentration d'oxygène dans l'eau des bacs expérimentaux.

La concentration d'oxygène a été artificiellement diminuée jusqu'à différentes concentrations à l'aide d'une injection d'azote dans les bassins.

4 Mesures invasives : concentration de cortisol et contenu en eau dans l'individu entier

Des mesures invasives sont couramment réalisées afin de mesurer les concentrations de cortisol (Auperin and Geslin, 2008; Auperin et al., 1997; Ruane et al., 2001). Pour cela, un prélèvement de sang est généralement réalisé sous la nageoire caudale du poisson. Ceci n'est possible que lorsque le poisson est suffisamment gros. Lorsque l'on s'intéresse à des juvéniles de moins de 5g (ce qui sera le cas dans nos études) cette méthode ne permet pas de récupérer suffisamment de sang pour réaliser cette mesure. Une autre technique consiste alors à broyer le poisson en entier dans de l'eau et de mesurer sa teneur totale en cortisol à partir d'une aliquote (Croke and McDonald, 2002; Ramsay et al., 2006). Le cortisol est extrait du broyat à l'aide d'un mélange d'éthyl-acétate/cyclohexane (1/1) et le cortisol est dosé par Radio Immuno Assay (RIA) selon la méthode décrite par Auperin et al. (1997).

Une aliquote de broyat de chaque poisson entier est également utilisée pour estimer le pourcentage d'eau dans l'individu. Pour cela, l'aliquote est pesée avant et après séchage pendant 48h dans un four à 115°C.

CHAPITRE 2

Etude de la variabilité des réponses adaptatives dans une expérience de confinement

Le challenge de confinement, consistant à placer des poissons dans un volume de nage étroit, est connu comme affectant fortement leurs mécanismes adaptatifs. La réaction de l'axe corticotrope au challenge de confinement est depuis longtemps connue chez la truite arc-en-ciel (Pickering and Pottinger, 1989). L'effet sur les contenus ioniques a également été démontré (Liebert and Schreck, 2006). Les réponses comportementales au confinement sont moins documentées mais les résultats de l'article présenté dans le chapitre 1 (Sadoul et al., 2014a) montrent que l'activité et la dispersion du groupe après le confinement sont sensiblement affectées. Le challenge de confinement semble donc être une perturbation appropriée à l'étude de la capacité de l'animal à faire face.

Nous avons donc soumis les lignées isogéniques A et R de truites arc-en-ciel à une perturbation aiguë, consistant en un stress de confinement d'une durée de 4 heures. Des juvéniles de chaque lignée (entre 2 et 5g) ont pour cela été placés dans des épuisettes créant une densité supérieure à 140 kg/m³. Les mesures décrites dans le chapitre 1 ont été réalisées avant, pendant, et après le confinement permettant de décrire la sensibilité et la capacité à récupérer des deux lignées. Les mesures non invasives (cortisol dans l'eau, consommation d'oxygène et comportement) ont été réalisées sur les mêmes aquariums au cours du temps. En parallèle, pour chaque point temporel de la cinétique de réponse, un bac expérimental était dédié aux mesures de cortisol total et de contenu total en eau. Ainsi, à chaque temps, les poissons du bac dédié étaient prélevés et euthanasiés. L'impact du challenge sur les mesures invasives et non-invasives a été analysé en comparant les valeurs avant le challenge avec les points temporels pendant et après le challenge. Les mesures non-invasives ont permis d'étudier les variabilités de réponse entre bacs. Pour cela, les cinétiques de réponse ont été analysées par périodes, avec une analyse de la résistance à la perturbation réalisée sur la période de confinement et une analyse de la capacité à récupérer réalisée sur la période post-perturbation. Chaque bac expérimental a alors été caractérisé par des indices de sensibilité et de capacité à récupérer pour chaque mesure réalisée.

Toutes les mesures ont été, comme prévu, affectées par le challenge chez les deux lignées isogéniques. Le contenu total en cortisol montre une cinétique identique à celle du cortisol mesuré dans l'eau. La lignée R s'est montrée plus résistante que la lignée A avec des amplitudes de réponses plus faibles en situation de challenge (pour les variables physiologiques notamment) et avec moins de variabilités dans les types de réponses. La lignée R semble donc présenter un degré de perturbation plus faible que la lignée A en situation de

confinement de courte durée. Ces résultats laissent penser que la lignée R est plus robuste que la lignée A.

Cette expérience a également montré des variabilités intra-lignées étonnamment importantes, avec notamment une forte variabilité inter-bac de la réactivité de l'axe corticotrope. Cette variabilité s'est avérée être fortement expliquée par la variabilité inter-bac des comportements agressifs en période pré-challenge. Il semblerait donc que l'histoire de vie ou même les événements qui se sont déroulés juste avant la perturbation aient un effet très fort sur les capacités des poissons à faire face à une perturbation.

Ces résultats sont présentés dans l'article 2 (ci-après) accepté dans la revue *Physiology and Behavior* en novembre 2014.

A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a confinement stress

B. Sadoul^{1*}, I. Leguen¹, V. Colson¹, N.C. Friggens^{2,3}, P. Prunet¹

¹ INRA, LPGP Fish Physiology and Genomics UR1037, Rennes, France

² INRA, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

³ AgroParisTech, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

*Corresponding author. Email address: bsadoul@rennes.inra.fr. Phone number: +332.23.48.50.36

Abstract

Robustness is a complex trait difficult to characterize and phenotype. In the present study, two features of robustness in rainbow trout were investigated: sensitivity and resilience to an acute stressor. For that purpose, oxygen consumption, cortisol release, group dispersion and group activity of two isogenic lines of juvenile rainbow trout were followed before and after an environmental challenge. The effect of a 4h confinement protocol (~140kg/m³), which is generally considered as a highly stressful challenge, was investigated. Temporal patterns produced by this experiment were analyzed using multivariate statistics on curve characteristics to describe physiological and behavioral adaptive systems for each isogenic line. The two isogenic lines were found to be highly divergent in their corticosteroid reactivity. However, no correlation between physiological and behavioral sensitivity or resilience was observed. Furthermore, the multivariate analysis results indicated two separate and independent fish group coping strategies, i.e. by favoring either behavioral or physiological responses. In addition, considerable intra-line variabilities were observed, suggesting the importance of micro-environment effects on perturbation sensitivities. In this context, cortisol release rate variability was found to be related to the pre-stress social environment, with a strong correlation between pre-stress aggressiveness and cortisol release rate amplitude. Overall, this approach allowed us to extract important characteristics from dynamic data in physiology and behavior to describe components of robustness in two isogenic lines of rainbow trout.

Keywords

Adaptation, stress, cortisol, aggressiveness

1. Introduction

Animal breeding programs are evolving, and are now aspiring to new goals. New challenges linked to environmental impact, animal welfare and therefore production sustainability have become important objectives in most breeding programs (Gamborg et Sandøe 2005; Nielsen et al. 2011; Grimsrud et al. 2013). In this context, robustness becomes a key trait for selection. Robustness has been defined by Knap (2005) as ‘the ability to combine high production potential with resilience to stressors allowing for unproblematic expression of a high production potential in a wide variety of environmental conditions’. However, robustness is a complex trait that is difficult to define and phenotype. The intention to select more robust animals is driven by the desire to obtain animals better able to maintain key life functions despite perturbations (Knap 2005; Napel, Bianchi, et Bestman 2006; Ellen et al. 2009). By characterizing its opposite, vulnerability, many authors have described robustness as a multidimensional concept generally encompassing three main components: exposure, sensitivity and resilience (Gallopín 2006; de Goede, Gremmen, et Blom-Zandstra 2013). Exposure relates to the degree and duration of a perturbation (Adger 2006). Sensitivity refers to the degree to which the system is modified or affected by the exposure and resilience to the time taken to recover from the exposure (de Goede, Gremmen, et Blom-Zandstra 2013).

By conducting an experiment using a controlled exposure to stressor, this study aims at better understanding and characterizing sensitivity and resilience in rainbow trout. The overarching hypothesis of the present study is that repeated measurements of physiological and behavioral traits before, during and after a perturbation of the biological system give a good estimation of its sensitivity and resilience to the stressor and therefore indications on its robustness. Confinement is generally considered as a stressful challenge for fish (Auperin et al. 1997; Pottinger et Carrick 1999; Quillet et al. 2014) but, on the contrary to stressors such as temperature changes, oxygen availability or parasitic infection, confinement is not directly challenging health status. Impact of confinement on several physiological such as osmoregulation, corticosteroid hormones, or behavioral traits like feed intake is now well documented (Ruane, Wendelaar Bonga, et Balm 1999; Auperin et al. 1997; Liebert et Schreck 2006) but, these responses do not help to better face that specific challenge. In that context, strong reactivity to confinement is considered in the present study as a non-robust feature

expending energy at the expense of other functions such as growth, immune responses or reproduction (Korte et al. 2005). Physiological and behavioral resistance and resilience to a confinement challenge are therefore considered in this study as robustness features. However, such definition cannot be generalized to all stressful situations and, for example in pig or in chicken, strong physiological reactivity was considered to be benefic in specific stressful conditions (Mormède et al. 2011).

In the present study, stress responses to a confinement were analyzed in two isogenic lines of rainbow trout with the aim to compare their robustness components. These lines were previously found to be highly divergent for their ability to grow on a plant-based diet during early-feeding (Geurden et al. 2013). Both lines show therefore divergent vulnerability for one specific trait in one specific condition. Given this, we decided to characterize these two lines using a different approach by looking at their responses to a perturbation. Therefore, we investigate here if these strains differ in their sensitivity to, and their ability to recover from, a confinement stress. Based on analysis of the physiological and behavioral response trajectories, associated with a principal component analysis, this study explores the variation in and approaches to characterizing some specific robustness traits in physiology and behavioral sciences.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical statements

Experiments were conducted within INRA facilities having authorization for animal experimentation (B29-777-02 and B35-238-6). Technical staff and scientists had personal authorizations to conduct animal experimentations in accordance with good animal practice delivered by the DDPP (Service de Protection et de Surveillance Sanitaire des Animaux et des Végétaux).

2.2. Isogenic lines

Two isogenic lines of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, were produced by crossing two fully homozygous but different sires (A22 and R23) with two homozygous females both from the same isogenic line (genetically identical females, B57). The resulting individuals were therefore heterozygous A22-B57 and R23-B57 (respectively referred to as A and R in the rest of the text). To avoid any bias due to maternal effects, females spawning the same day were

used. The ova were mixed and redistributed in two batches, each being fertilized the same day by one male. Thus, the between-line differences were expected to be genetic only.

Fish of both lines were reared in the same conditions and using the same commercial diet.

Both lines have been previously characterized for their adaptation to a plant-based diet challenge (Geurden et al., 2013).

2.3. Experimental design

The experiment was carried out in two replicates one month apart. Within each replicate, both lines were used.

2.3.1. Acclimation to experimental aquaria

At a mean weight of 1.8g, 16 fish having similar size of one line were placed in a 1.7L aquarium for a 2 weeks acclimation time. For each line, 4 identical aquaria were used. All aquaria were supplied with the same water flow, and were visually followed using two cameras placed above. They were also equipped with a small closed external water circuit taking water on one side of the aquaria and bringing it back on the other side. This system allowed, when needed, continuous measures of O₂ concentrations using flow-through oxygen sensors linked to a multi-channel fiber optic oxygen transmitter (oxy-4 mini from PreSens, Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany). The system also allowed water sampling (450mL) at given time points.

After two days of acclimation, fish ate again and were hand-fed with the same commercial diet as during rearing.

2.3.2. Confinement protocol and samples collection

The experiment consisted of a confinement challenge of 4 hours duration with measurements at 8 time points, before, during and after the challenge (see Figure 23).

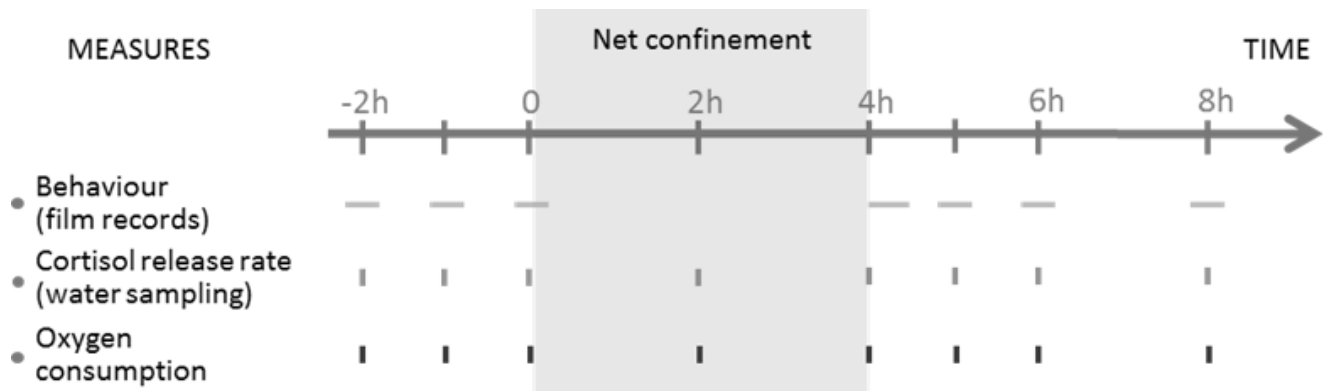


Figure 23. Design of the confinement experiment during time.

Aquaria are followed during time for behavior, cortisol release rate and oxygen consumption. Each horizontal line represents a 10 minutes film record taken by camera placed above the aquaria. Vertical lines correspond to the water sampling points and the oxygen consumption measurements. At time 0, a 4-hour confinement challenge is performed by enclosing all the fish of one aquarium in a net, creating a density of 140kg/m³.

The confinement challenge consisted in grouping all fish of one aquarium in an immersed net of 0.240L creating a density of 140 kg/m³. At each time point, video recording, water sampling and oxygen measures were performed for further analysis as detailed below. At each time point, 10 minutes of video were recorded, except for the period just after confinement where fish were followed during 30 minutes. The time point 4, where fish are confined, was not recorded.

2.3.3. Replicate

The second replicate used naïve fish from the same fecundation. Fish weighed 3.8 g at the beginning of the acclimation period. To keep a density similar to the first experiment, only 12 fish were placed per aquarium of 2.3 L. The size of the confinement net was increased in consequence.

2.3.4. Fish sacrifice for invasive measures

In parallel to the first replicate, 8 aquaria per line were added to the experiment enabling us to obtain invasive measures at each time point shown in Figure 23 (one aquarium per line and per time point). These aquaria were treated identically to the other aquaria, but were not equipped with camera nor closed external water circuit. At a given time point, all fish from the aquarium were caught and killed with 2-phenoxyethanol and frozen at -20°C.

2.4. Sample analysis

2.4.1. Group behavior measurements

Two group behavior indexes were calculated from the video using the method developed by Sadoul et al. (Sadoul et al., 2014a). These group behavior indexes translate group dispersion of the shoal in the aquarium and group swimming activity. The method gives a value for both indexes every half second of the video. We summarized these data by calculating the mean for each index and aquarium per 10 minutes.

In addition, in each aquarium, aggressive acts were counted for the 3x10 minutes of video before the confinement challenge. An aggressive act was defined as a bite of one individual on another or as a bite attempt with chase.

2.4.2. Oxygen consumption rate

Oxygen consumption rate in each aquarium (MO_2 , $mgO_2/kg/h$) was measured by using the experimental aquaria as open respirometers. Oxygen concentration (mg/L) was assessed every 15 seconds using 2 calibrated multi-channel fiber optic oxygen transmitters Oxy-4 mini from Presens. Water supply within the aquaria was stopped during 5 minutes to measure oxygen uptake. Oxygen concentration decreased at a rate equal to the aquarium oxygen consumption. This data was corrected for total fish weight in each aquarium to obtain oxygen consumption per kg of fish.

2.4.3. Cortisol release rate and Whole body cortisol concentration

Corticosteroids were extracted from water samples using a method adapted by Greenwood et al. (Greenwood et al., 2001) and Ellis et al. (Ellis et al., 2004b). Briefly, water samples were filtered by gravity through a nylon filter (100 μ m pore-size). Samples were then peristaltically pumped at about 25ml/min through successive filters (2 of 11 μ m, 1 of 2.5 μ m and 1 of 0.45 μ m pore-size) and then through an activated solid phase extraction cartridge (Sep-pak® Plus C18, Waters Ltd., U.K.). Approximately 400 mL were processed per sample with the actual volume determined using a graduated test-tube. After pumping, corticosteroids were immediately retrieved from the cartridge by elution with 5mL of organic solvent (ethylacetate/cyclohexane, 1/1 vol/vol). Eluate was then frozen at -20°C overnight, transferred to a fresh tube to conserve only the organic phase and evaporated at 40°C. Corticosteroids are

then re-dissolved in 200µl of ethanol and stored at -20°C. Cartridges were reused after reactivation up to 5 times. No effect of the reuse was observed.

Frozen fish were individually weighed and crushed in two volumes (ml/g) of milli-Q water using an ultra-turrax until a homogenized solution was obtained. Homogenates were then stored at -20°C. Corticosteroids were extracted from aliquots of the homogenates using organic solvent (ethylacetate/cyclohexane, 1/1 vol/vol).

Cortisol measurements from water or body samples were carried out using a RIA procedure as previously described by (Auferin et al., 1997).

2.4.4. Whole-body water content

Whole body water content was estimated by calculating the difference of weight before and after drying aliquots of crushed fish homogenates at 105°C during 24 hours.

2.5. Data analysis

The analyses were executed using the free software R 2.14.0 (<http://cran.r-project.org/>).

Behavior, cortisol release rate and oxygen consumption data were obtained as repeated measures on same aquarium during time. These data are referred to as repeated measures data in the rest of the text to distinguish them from the data, referred to as point measures, for whole body water content, and whole body cortisol concentration where the temporal pattern relative to the challenge was obtained on different aquaria during time.

2.5.1. Testing time, line and replicate effects on all measures

Repeated measures data were analyzed using the following complete linear mixed model:

$$Y_{ijkl} = \mu + time_i + line_j + replicate_k + time_i:line_j + replicate_k:time_i + replicate_k:line_j + replicate_k:time_i:line_j + aquaria_l + \varepsilon_{ijkl}$$

With Y_{ijkl} , the value of $line_j$ for $replicate_k$ within $aquaria_l$ at $time_i$ (qualitative) and ε_{ijkl} the associated residual. Time was fit as discrete variable with a mean estimated for each time point independently. Aquarium was fit as a random variable assuming a mean of 0 and a normal distribution.

For oxygen analysis, one aquarium in the first replicate was removed because of a very strong divergence compared to other aquaria.

Point data were analyzed using the following complete linear model:

$$Y_{ijf} = \mu + time_i + line_j + time_i:line_j + \varepsilon_{ijf}$$

With Y_{ijf} , value of $line_j$ for $fish_f$ at $time_i$ (discrete variable) and ε_{ijf} associated residual.

For repeated and point data, the effect of the challenge was tested by comparing the mean of the three points before the challenge to the points during or after the challenge, using contrasts based on the linear combination of model parameters.

2.5.2. Recovery and amplitude response estimations per aquarium

Variations between individual aquaria of repeated measures data were further analyzed to explore correlations between behavioral and physiological responses. Individual variation in amplitude of the response data was obtained using the following procedure:

1. Extract of the residuals from the general response by fitting the following linear model to the time points 0, 2 and 4 hours:

$$Y_{ikl} = \mu + time_i + replicate_k + replicate_k:time_i + \varepsilon_{ikl}$$

With Y_{ikl} , the value of $replicate_k$ for $aquarium_l$ at $time_i$ (discrete) and ε_{ikl} associated residual.

2. Fit the following linear regression on the residuals assumed to have a linear trend with respect to the time:

$$\varepsilon_{il} = \mu + aquaria_l + a_l * aquaria_l:time_q + \varepsilon_{il}$$

With $time_q$ the time fit as a continuous variable.

The value of the slope of this model (a_l) gives an estimation of the relative amplitude of the response for one aquarium and one measure compared to the mean. Aquaria showing a high a_l in the amplitude of the response analysis are considered as more sensitive aquaria than the mean.

The same was performed for the recovery response with time points between 4 and 8 hours. Aquaria showing very negative a_l in the recovery analysis present better recovery capacities than the mean.

The relationships between amplitude and recovery variability across measures were explored using Principal Component Analysis (PCA), to reveal relationships between all measurements

(physiology and behavior measures) and observations (aquaria). PCA was performed using data from recovery and amplitude of cortisol release rate, oxygen consumption, dispersion index and activity index. The data were all scaled to mean 0 and standard deviation 1.

3. Results

3.1. The effect of confinement on the physiological and behavioral data

Mean per time point and line of the repeated measures data are presented in Figure 24. This includes the following parameters: cortisol release, oxygen consumption, dispersion index and swimming activity index. All the time points during and after the challenge were statistically compared individually to the mean of the three time points before the challenge (Figure 24).

There was a significant effect of time on all physiological and behavioral measures (p -values <0.001), indicating that all were impacted by the confinement. Indeed, cortisol release rate increased significantly during the challenge for both lines. Similarly, oxygen consumption rate was significantly affected by the challenge for both lines, with a significant increase after 2 hours of confinement. The two group behavior indexes were both significantly affected by the challenge with results at 4 hours significantly increased compared to baseline for both lines.

A significant effect of line was also observed for behavioral index and cortisol release data (p -values <0.01) revealing that the two lines differ significantly before, during and after the challenge in these measures. In addition, there were significant differences in cortisol release rate due to replicate (data not shown), with the second replicate being globally 50% (p -value <0.001) lower than the first replicate.

There was also a significant interaction between replicate and time (data not shown) for the behavioral measures, with the time point 4h being 25% (p -value <0.05) lower in replicate 1 than in replicate 2 for the activity index and the time point 4h10 being 18% (p -value <0.01) lower in replicate 1 than replicate 2 for the dispersion index. Other time points were not significantly different between the two replicates. Both behavioral index showed also a significant interaction between replicates and lines (data not shown), with line R being 31% (p -value <0.05) lower in replicate 2 than in replicate 1 for the activity index, although line A was not significantly different between the two replicates. For the dispersion index, line A was 29% (p -value <0.001) lower in replicate 1 than in replicate 2, line R was not found to be significantly different between the two replicates.

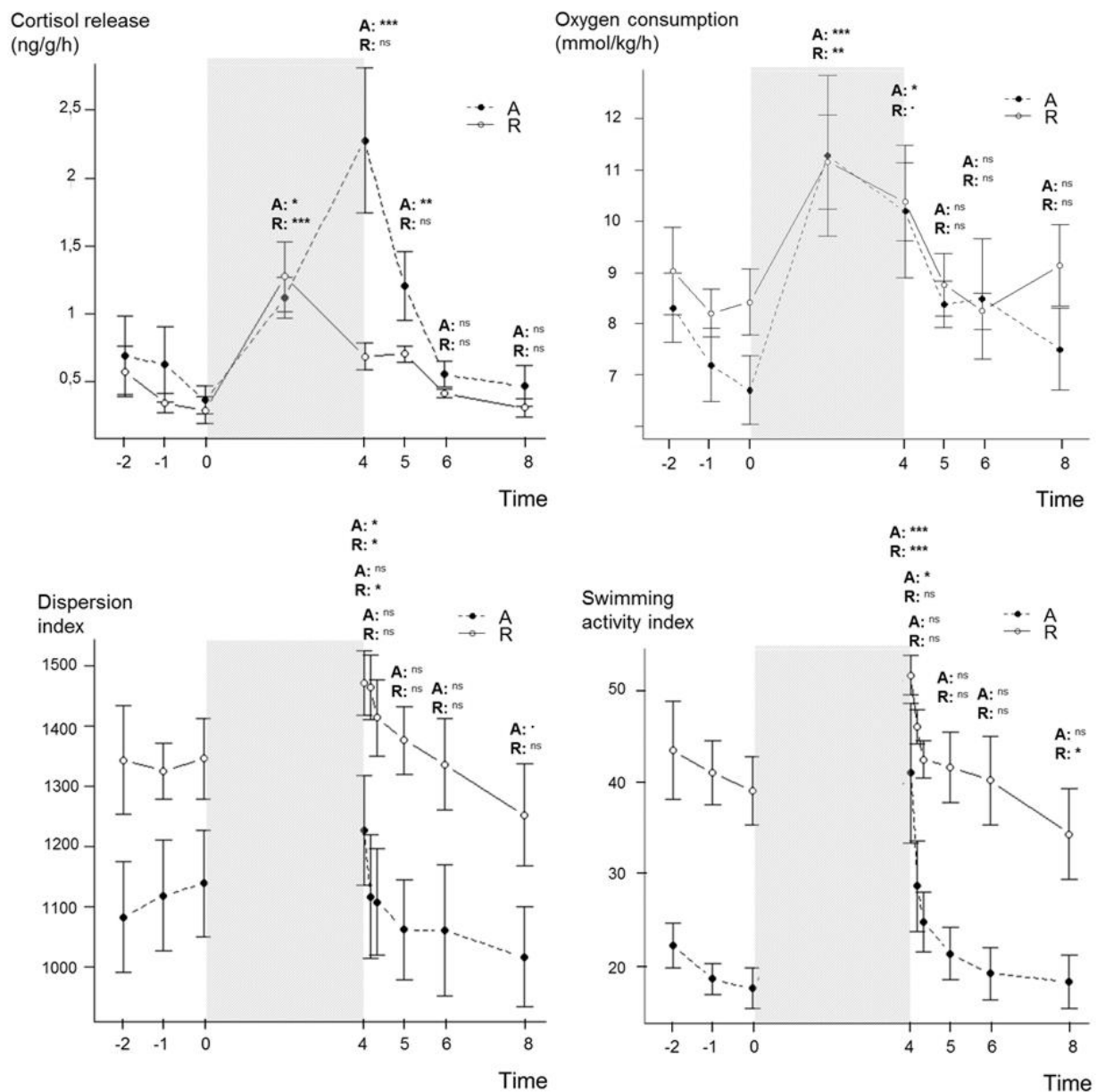


Figure 24. Impact of a confinement challenge on repeated measures of physiological and behavioural measures in two isogenic lines (A and R) of rainbow trout.

Each time-point post-confinement is compared to the mean of the 3 pre-challenge time points in each isogenic line. A significant difference is noted * (p-value<0.05), ** (p-value<0.01) or *** (p-value<0.001). A tendency is noted . (p-value<0.1).

Cortisol release rate displayed a significant effect of the interaction time and line, indicating that the two lines present divergent temporal patterns, with line R showing a cortisol release rate 70.1% lower than line A at time point 4h. Thus, line A was still very significantly different from baseline at 4 hours, in contrast to line R which was no longer significantly different from baseline at 4 hours. Line A was back to initial values 2 hours after the end of the challenge.

Point data for each line are presented in Figure 25. The same effects as for cortisol release were found on whole body cortisol concentrations, with time, line and their interaction being significant. No significant effect of line was observed for whole body water content, but interestingly, this parameter was affected by the challenge of confinement for both lines, however, no effect of the interaction was observed (Figure 25).

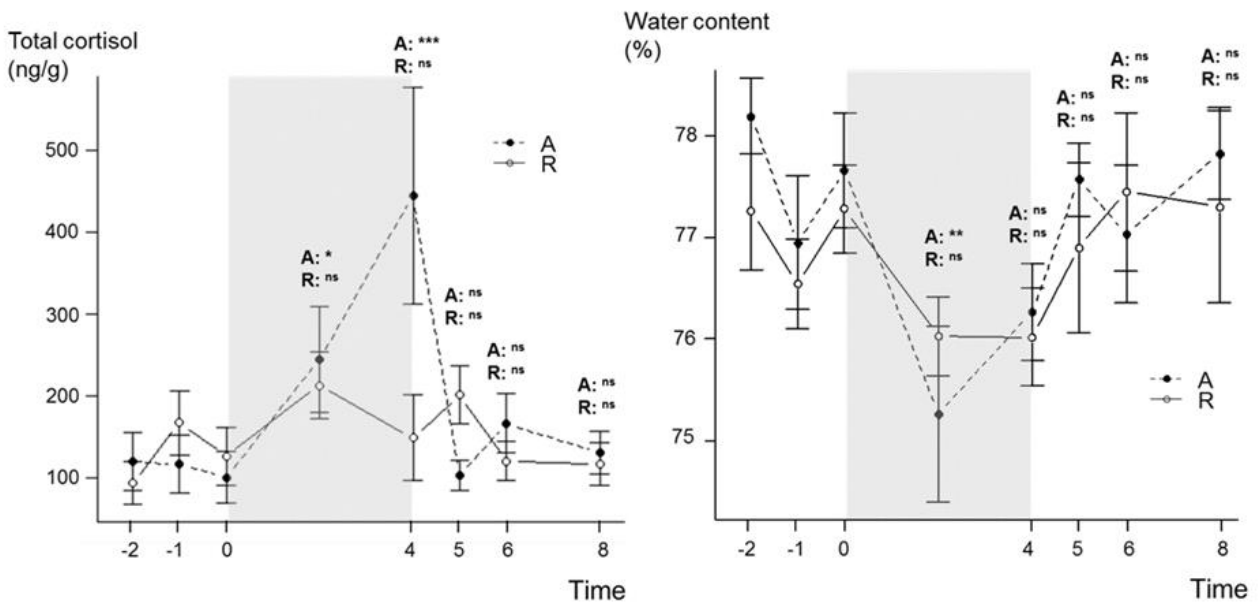


Figure 25. Impact of a confinement challenge on whole body cortisol concentrations and water content in two isogenic lines (A and R) of rainbow trout.

Each time-point post-confinement is compared to the mean of the 3 pre-challenge time points in each isogenic line. A significant difference is noted * (p-value<0.05), ** (p-value<0.01) or *** (p-value<0.001).

3.2. Multivariate analysis and variability between aquaria

A PCA was performed on amplitude and recovery characteristics of all repeated measures expressed relative to the overall mean amplitude and recovery for each measure i.e. characterizing the variability between aquaria. Figure 26 shows the first two principal components that together accounted for 66% of the total variance. Variables that are close together are highly positively correlated. The one that are opposed are negatively correlated.

Recovery variables were found to be globally opposed to amplitude variables, i.e. these variables are negatively correlated (see also Table 5). These results show that aquaria having strong amplitudes of response to the challenge have also strong recovery rates.

The first component of the PCA differentiated variables into behavioral (swimming activity and dispersion index) recoveries and behavioral amplitudes. Aquaria separated on this axis (Figure 26b) show therefore very divergent behavioral reactions to the challenge. The second principal component was principally defined by physiological variables (oxygen consumption and cortisol release rate). Aquaria separated on this axis (Figure 26b) therefore show very divergent physiological reactions to the challenge.

Behavioral and physiological variables are therefore to a large extent orthogonal in terms of explaining variability in responses, highlighted by the low correlation between these variables (see also Figure 26b). This finding suggests that two distinct strategies to cope with the challenge were adopted: either by modifying preferentially the behavior or the physiology.

Confidence ellipses around the two lines in the individual plot (Figure 26b) show that both lines display a similar variability for behavior traits. However, for physiological traits, line A was found to be much more variable than line R. The two isogenic lines did not differ much on the first component indicating that both lines had, on average, the same behavioral response to the challenge. In contrast, the two lines differed strongly on the second component. Their response to the challenge differed therefore principally on a physiological basis. Line A shows stronger amplitudes of response for cortisol release rate and oxygen consumption.

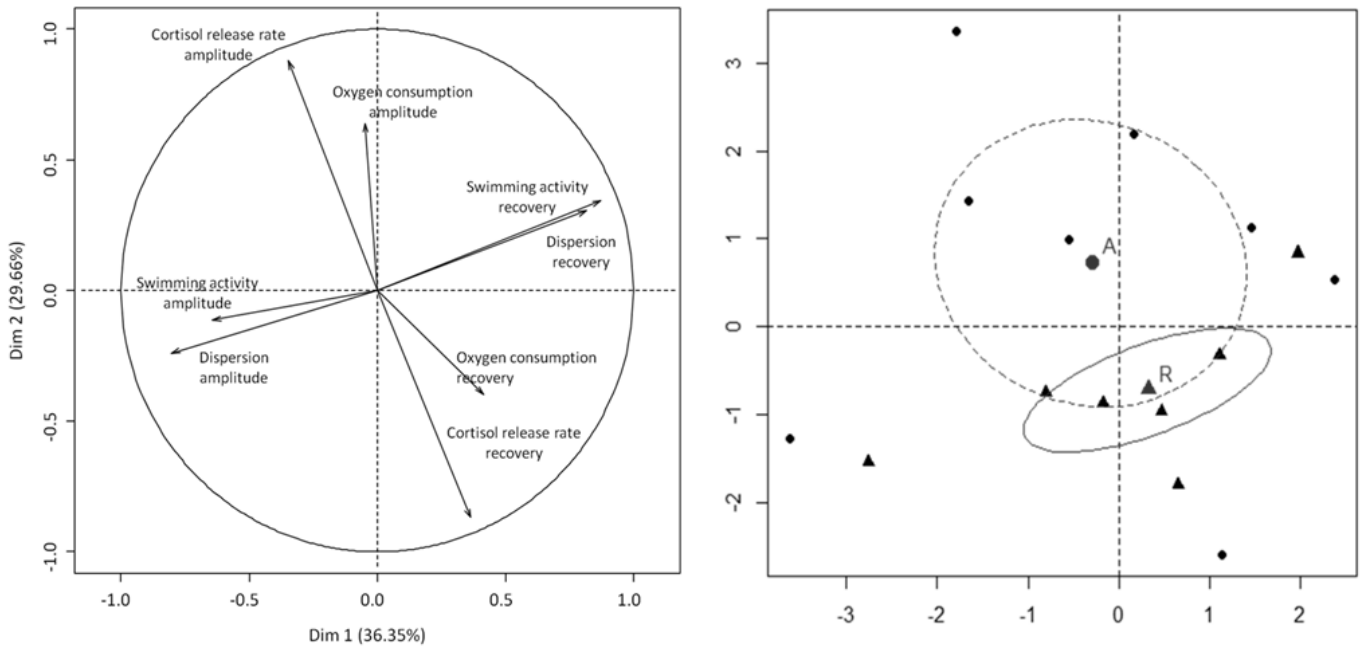


Figure 26. Principal component analysis of variability in physiological and behavioral amplitudes and recoveries in a confinement experiment for two isogenic lines of rainbow trout (A and R).

The origin of the coordinate system represents the mean physiological and behavioral responses and recoveries for each measure (across lines). PCA loadings (left graph) and scores (right graph) plots are displayed for principal components 1 and 2 (respectively Dim 1 and Dim 2) of the analysis. Arrow heads indicate the loadings for each of the variables taken into account for the analysis. Opposed variables are negatively correlated and orthogonal variables weakly correlated. Dark points and dark triangles on the right graph differentiate respectively A and R aquaria. Ellipse around the mean of A (red point) and R (red triangle) represents the confidence ellipse of each isogenic line.

Table 5. Correlation between amplitude and recovery of physiological and behavioral responses to a confinement for each measure.

Data are from the 16 different aquaria expressed relative to the mean response (across lines). Shaded coefficients highlight a significant correlation between the two variables (p-value<0.05).

	Dispersion recovery	Oxygen consumption recovery	Swimming activity recovery	Cortisol release rate recovery	Dispersion amplitude	Oxygen consumption amplitude	Swimming activity amplitude
Dispersion recovery	1						
Oxygen consumption recovery	0,19	1					
Swimming activity recovery	0,84	0,1	1				
Cortisol release rate recovery	0,03	0,33	0,05	1			
Dispersion amplitude	-0,7	-0,22	-0,63	-0,09	1		
Oxygen consumption amplitude	0,07	-0,22	0,17	-0,38	-0,11	1	
Swimming activity amplitude	-0,26	-0,19	-0,63	-0,09	0,42	0,03	1
Cortisol release rate amplitude	-0,01	-0,32	-0,04	-0,99	0,06	0,4	0,08

3.3. Number of aggressions before the confinement stress and correlation with cortisol release rate response

There was considerable variability in aggressiveness before the challenge between aquaria was observed. Line A was found to be significantly more aggressive than line R (Figure 27). Furthermore, a strong correlation was found between cortisol release rate response and number of aggressions before the confinement stress (Figure 28).

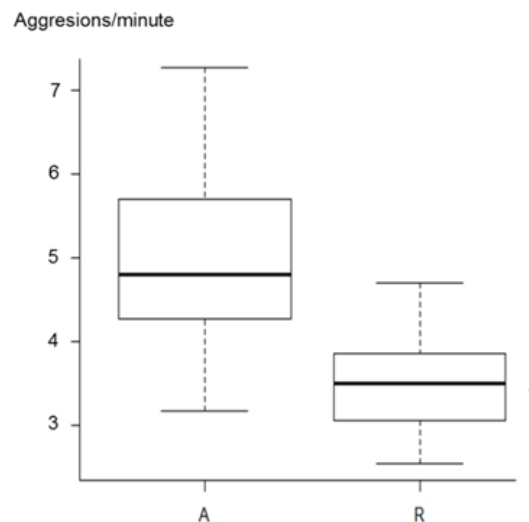


Figure 27. Number of aggressions per minute before the confinement stress in lines A and R.

The asterix indicate a significant difference between the two mean (p-value<0.05).

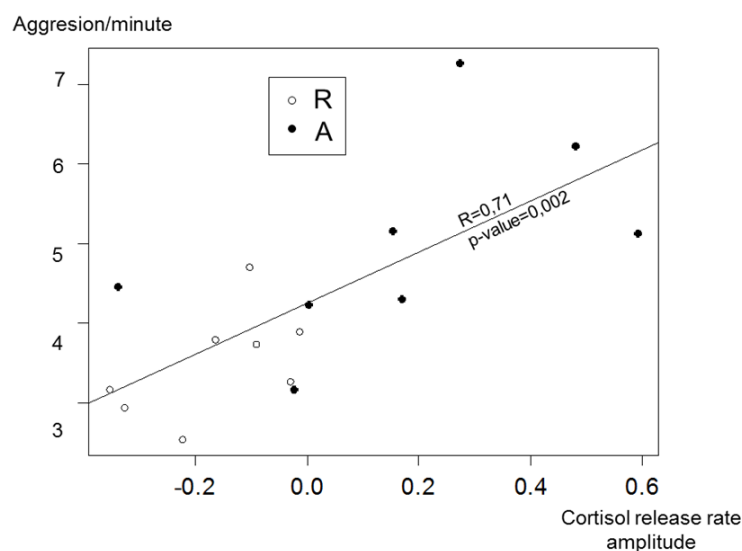


Figure 28. Correlation between cortisol release rate amplitude in a confinement experiment and the number of aggressions per minute before the confinement challenge for two isogenic lines (A and R).

Cortisol release rate amplitude was estimated from the linear shape of cortisol within the confinement period after adjustment for time fixed and replicate effects.

4. Discussion

In this study, effects of an acute stressor were examined in two isogenic lines. Perturbations in physiological and behavioral responses were observed and gave indications on the degree of perturbation of the two lines. Using an individual analysis followed by a multivariate analysis, this study contributes to the characterization underlying components of robustness in fish.

2.1. Effect of confinement on physiological and behavioral temporal patterns

Confinement is now well documented for being a strong stressor in aquaculture (Auperin et al. 1997; Ruane, Wendelaar Bonga, et Balm 1999). We therefore hypothesized for both lines a significant effect of the confinement challenge on the measured parameters. Indeed, both lines showed an acute stress response during the net-confinement protocol. By describing several physiological and behavioral temporal patterns before, during and after a 4-hour confinement stress, this study contributes to a better characterization of confinement stress responses including both amplitude and recovery periods.

Two hours after the onset of confinement, whole-body cortisol and cortisol release rate increased significantly in both lines, similar to previous studies on plasma cortisol and whole-body cortisol (Barton et Iwama 1991; Pottinger et Mosuwe 1994). Whole body cortisol concentrations and water cortisol release rates were found to be strongly correlated, a result consistent with data from Scott and Ellis (Scott et Ellis 2007) who compared plasma cortisol concentrations and cortisol release rates. Results on water cortisol release rates were found to be in the same range of values as previous studies (Ellis, James, et Scott 2005; Scott et Ellis 2007), although our fish were much smaller. These findings reinforce the reliability of the cortisol release rate measure, first introduced by Ellis et al. (Ellis et al. 2004) and give reference values of cortisol release rate for young juvenile rainbow trout in normal and stressed conditions.

After the confinement challenge, swimming activity and dispersion were found to be significantly increased in both lines. These results are consistent with literature indicating an increase of swimming activity in stressed fish, interpreted as an avoidance behavior. Thus, extreme temperatures (Olla et Studholme 1971), pH changes (Nakamura 1986), or abiotic factors (Henry et Atchison 1984; Eissa et al. 2010) are well known for their consequences on swimming activity in fish. The dispersion of the shoal is closely related to the locomotor activity and we usually observed either an immobile aggregative group or a mobile dispersed

group. This study confirms the first results found by Sadoul et al (Sadoul et al. 2014) on the swimming activity and dispersion increase after a confinement challenge in trout.

As far as we are aware, the present study is the first to report the effect of an acute confinement stress on oxygen uptake in fish. Our study indicates an increase in oxygen consumption despite the reduction of swimming volume and probably therefore activity. Long-term crowding effects on oxygen consumption have been previously studied but show divergent results (Laursen et al. 2013; McKenzie et al. 2012). However, it has been shown that cortisol treatment significantly increases oxygen consumption in fish (Morgan et Iwama 1996; Liew et al. 2013). Therefore, our observed oxygen uptake increase is probably a direct consequence of stress-induced cortisol increase. However, a non-significant correlation between cortisol release rate and oxygen consumption amplitudes ($R=0.33$ in table 1) was found. This correlation calculated on the basis of relative distances to the mean, focuses on a more precise level and indicates that despite a general similar pattern, cortisol is not the only parameter influencing oxygen uptake.

Interestingly, whole body water contents were found to decrease in both lines during the challenge. This study is the first investigating such a measure on fish experiencing a confinement challenge. One explanation for these results could be a diuresis increase during the challenge. Diuresis modification was already observed in several experiments during stress or cortisol treatment (McDonald et Milligan 1997; Parker et al. 2003).

After the challenge, all measures were found to regain their pre-stress values. By looking at individual temporal patterns, we could compare variability in amplitude and recovery in each measured parameters. Strong negative correlations between amplitude and recovery responses were found (Table 1). The diversity in recovery rates between all aquaria is therefore globally explained by the variability in their amplitude of response. These results indicate consistency in the recovery capacities between and within line in terms of time taken to recover.

2.2. Within line variability

Both lines showed behavioral and physiological modifications in response to the challenge. However, by looking at each aquarium individually, important within line variabilities were found relative to the mean responses. The PCA analysis highlighted two axis of variability of the responses, one linked to physiological responses, the other to behavioral responses. These

two orthogonal axes translate two different strategies to face the challenge. Aquaria differ from the mean either through their behavioral responses or their physiological responses.

The variability on the physiological axis was found to be substantially explained by pre-challenge social environment. A significant positive correlation between pre-challenge aggressiveness and cortisol reactivity was observed. These results suggest that pre-challenge state is an essential feature in the reactivity to a stressor. Previous studies on mammals demonstrated that mild stress before a novel challenge induce an increased corticoid response compared to unstressed controls (Dobráková et al. 1993; Bhatnagar et Dallman 1998). This phenomenon, called facilitation might be the explanation for our observed correlation. The pre-stress aggressiveness could be considered as a mild stress for the individuals affecting their adaptive capacities when facing a new challenge. However, these results might also be a consequence of divergences in the perception of the challenge. Indeed, confinement can be considered as a social stress and its intensity is maybe highly dependent of the pre-challenge social network.

The important within line variability was also remarkable given the isogenic nature of the fish and the common raising environment. Despite our strong effort to control environmental conditions, these variations are probably mainly due to between aquarium effect during acclimation time and point out the importance of life history and environmental impact on stress responses even during very short period of time, i.e. 2 weeks of acclimation in the present study.

2.3. Between line variability

Beside the new approach to study robustness, this study aimed at characterizing adaptive capacity in two isogenic lines of rainbow trout. These lines were previously chosen for their divergent ability to cope with a plant-based diet, R having a better early growth rate than A when fed with a plant-based diet from the first meal (Geurden et al. 2013). Knowing this important feature, we hypothesized that the two lines differ on a more global robustness basis.

The multivariate analysis of the responses showed that on average, both lines differ only for physiological traits, and more especially cortisol amplitude. Thus, line A was found to be more sensitive to the challenge than line R, however, this was without consequences on behavioral sensitivity. The two lines are therefore a good model for studying contrasted groups of fish with pronounced difference in HPI reactivity. This model is an alternative to

high responsive (HR) and low responsive (LR) strains previously well studied (Pottinger et Carrick 1999; Øverli et al. 2002; Trenzado, Carrick, et Pottinger 2003; Joachim Schjolden et al. 2005), with the important advantage of having exactly the same genotype between individuals within each line.

Globally both lines showed similar behavioral responses to stress, however initial values were very different. Indeed, dispersion and swimming activity were globally more important for line R. Aggressiveness was, in parallel, higher for line A. Differences in the nature of behavioural and physiological responses are often referred to as different coping strategies (J.M Koolhaas et al. 1999). First developed for mammals, this concept describes proactive individuals as being globally more bold and aggressive and showing a low corticosteroids response to an acute stress, compared to reactive individuals that are shy and peaceful, and having a strong corticosteroid response (J.M Koolhaas et al. 1999; Brelin, Petersson, et Winberg 2005; Joachim Schjolden et al. 2005). Although this concept is now reconsidered in mammals (J. M. Koolhaas et al. 2010), these divergences in coping styles have also been deeply studied in fish, with proactive fish showing, in particular, low cortisol reactivity, high group activity, and more aggression (Øverli et al. 2002; Brelin, Petersson, et Winberg 2005; Joachim Schjolden et al. 2005; J. Schjolden et al. 2006). According to these typologies, line R would appear to be associated with proactive individuals when considering cortisol response and activity. This categorization is strengthened if we estimate that bolder animals (considered as proactive individuals) show lower group cohesion (Cote et al. 2010; Pike et al. 2008; Croft et al. 2009) as displayed by aquaria in line R. However, the low aggression results for line R are not consistent with this categorization and lead us to reconsider the coping strategies of groups of individuals. An important difference between the present study and the above cited studies is that they considered individual fish kept in isolation, e.g. to determine its aggressiveness toward an intruder in its aquarium or to determine its foraging capacities. These studies did not consider social context although very important for personality and aggressiveness descriptions (Geffroy et al. 2014). In contrast, the present study measured aggression in group-housing conditions. Knowing that coping strategies have a significant genetic component (Øverli, Winberg, et Pottinger 2005; Jaap M. Koolhaas et al. 2007), our study introduces interesting results on group coping strategies. It would appear that, by grouping together only genetically aggressive (line A) or passive (line R) individuals in a same aquarium might inverse usual physiological and behavioral correlations within

coping strategies. These results suggest, therefore, that social context has a stronger effect than personality traits on corticosteroid reactivity.

2.4. Back to robustness

Previous work demonstrated how analysis of multivariate time-series measurements help quantifying animal status related to the degree of infection (Højsgaard et Friggens 2010). Our study provides insights towards a method to characterize the degree of perturbation of the biological system based on behavioral and physiological data. In this study, data suggest that line A was more perturbed than line R with a stronger and more variable physiological sensitivity to the stressor.

Assuming that the non-life-threatening nature of a confinement challenge, we hypothesize that the individuals showing the strongest perturbation to the stressor are triggering irrelevant responses, non-adapted with robustness characteristics (Wingfield 2013), because of their energetic cost and consequences on health and welfare (Ashley 2007). We consider therefore that line R is, in this study, the line showing the best robustness characteristics. Future work need to be conducted to estimate the ability of the line to face potentially life-threatening challenges, and therefore to further describe robustness of the two lines.

3. Conclusions

This study shows that the two isogenic lines differ strongly in their sensitivity to a confinement challenge, with line A displaying a higher reactivity of the physiological traits during the confinement challenge compared to line R. These results suggest that line R is more robust than line A. Genetic determination of underlying components of robustness is therefore clear. However, this study also emphasizes the important effect of emotional state prior the perturbation on these components. Finally, this study described the personality traits of the two isogenic lines of rainbow trout.

Aknowledgements

The authors thank Claudiane Valotaire and Frederic Borel for their help in designing and building the aquaria and the water distribution system. We are also grateful to David McKenzie and Guy Claireaux for having lent their oxymeters. This work was supported by funds from the Institut National de la Recherche Agronomique. The first author received a fellowship from the Région Bretagne.

References

- Adger, W. Neil. 2006. « Vulnerability ». *Global Environmental Change* 16 (3): 268-281. doi:10.1016/j.gloenvcha.2006.02.006.
- Ashley, Paul J. 2007. « Fish welfare: Current issues in aquaculture ». *Applied Animal Behaviour Science* 104 (3-4): 199-235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001.
- Auperin, B., J.F. Baroiller, M.J. Ricordel, A. Fostier, et P. Prunet. 1997. « Effect of Confinement Stress on Circulating Levels of Growth Hormone and Two Prolactins in Freshwater-Adapted Tilapia (*Oreochromis niloticus*) ». *General and Comparative Endocrinology* 108 (1): 35-44. doi:10.1006/gcen.1997.6938.
- Barton, Bruce A., et George K. Iwama. 1991. « Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids ». *Annual Review of Fish Diseases* 1: 3-26. doi:10.1016/0959-8030(91)90019-G.
- Bhatnagar, S., et M. Dallman. 1998. « Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress ». *Neuroscience* 84 (4): 1025-1039. doi:10.1016/S0306-4522(97)00577-0.
- Brelvi, Daniel, Erik Petersson, et Svante Winberg. 2005. « Divergent Stress Coping Styles in Juvenile Brown Trout (*Salmo Trutta*) ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040 (1): 239-45. doi:10.1196/annals.1327.033.
- Cote, Julien, Sean Fogarty, Tomas Brodin, Kelly Weinersmith, et Andrew Sih. 2010. « Personality-Dependent Dispersal in the Invasive Mosquitofish: Group Composition Matters ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, novembre, rspb20101892. doi:10.1098/rspb.2010.1892.
- Croft, Darren P., Jens Krause, Safi K. Darden, Indar W. Ramnarine, Jolyon J. Faria, et Richard James. 2009. « Behavioural Trait Assortment in a Social Network: Patterns and Implications ». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63 (10): 1495-1503. doi:10.1007/s00265-009-0802-x.
- De Goede, D. M., B. Gremmen, et M. Blom-Zandstra. 2013. « Robust agriculture: Balancing between vulnerability and stability ». *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 64-65 (septembre): 1-7. doi:10.1016/j.njas.2012.03.001.
- Dobráková, Marta, Richard Kvetňanský, Zdenka Opršalová, et Daniela Ježová. 1993. « Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats ». *Psychoneuroendocrinology* 18 (3): 163-174. doi:10.1016/0306-4530(93)90001-2.
- Eissa, B. L., N. A. Ossana, L. Ferrari, et A. Salibián. 2010. « Quantitative Behavioral Parameters as Toxicity Biomarkers: Fish Responses to Waterborne Cadmium ».

- Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58 (4): 1032-1039. doi:10.1007/s00244-009-9434-4.
- Ellen, E. D., L. Star, K. Uitdehaag, F. W. A. Brom, M. Klopčič, R. Reents, J. Philipsson, et A. Kuipers. 2009. « Robustness as a Breeding Goal and Its Relation with Health, Welfare and Integrity. », 45-53.
- Ellis, T, JD James, et AP Scott. 2005. « Branchial Release of Free Cortisol and Melatonin by Rainbow Trout ». Journal of Fish Biology 67 (2): 535-540. doi:10.1111/j.1095-8649.2005.00740.x.
- Ellis, T, JD James, C Stewart, et AP Scott. 2004. « A Non-Invasive Stress Assay Based upon Measurement of Free Cortisol Released into the Water by Rainbow Trout ». Journal of Fish Biology 65 (5): 1233-1252. doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00499.x.
- Gallopín, Gilberto C. 2006. « Linkages between vulnerability, resilience, and adaptive capacity ». Global Environmental Change 16 (3): 293-303. doi:10.1016/j.gloenvcha.2006.02.004.
- Gamborg, Christian, et Peter Sandøe. 2005. « Sustainability in farm animal breeding: a review ». Livestock Production Science 92 (3): 221-231. doi:10.1016/j.livprodsci.2004.08.010.
- Geffroy, Benjamin, Noëlle Bru, Simplicie Dossou-Gbété, Cédric Tentelier, et Agnès Bardonnnet. 2014. « The Link between Social Network Density and Rank-Order Consistency of Aggressiveness in Juvenile Eels ». Behavioral Ecology and Sociobiology, avril, 1-11. doi:10.1007/s00265-014-1719-6.
- Geurden, Inge, Peter Borchert, Mukundh N. Balasubramanian, Johan W. Schrama, Mathilde Dupont-Nivet, Edwige Quillet, Sadasivam J. Kaushik, Stéphane Panserat, et Françoise Médale. 2013. « The Positive Impact of the Early-Feeding of a Plant-Based Diet on Its Future Acceptance and Utilisation in Rainbow Trout ». PLoS ONE 8 (12): e83162. doi:10.1371/journal.pone.0083162.
- Greenwood, LN, AP Scott, ELM Vermeirssen, CC Mylonas, et M Pavlidis. 2001. « Plasma Steroids in Mature Common Dentex (Dentex Dentex) Stimulated with a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist ». General and Comparative Endocrinology 123 (1): 1-12. doi:10.1006/gcen.2000.7519.
- Grimsrud, K. M., H. M. Nielsen, S. Navrud, et I. Olesen. 2013. « Households' willingness-to-pay for improved fish welfare in breeding programs for farmed Atlantic salmon ». Aquaculture 372-375 (janvier): 19-27. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.009.
- Henry, Mary G., et Gary J. Atchison. 1984. « Behavioral Effects of Methyl Parathion on Social Groups of Bluegill (Lepomis Macrochirus) ». Environmental Toxicology and Chemistry 3 (3): 399-408. doi:10.1002/etc.5620030305.

- Højsgaard, S., et N. C. Friggens. 2010. « Quantifying degree of mastitis from common trends in a panel of indicators for mastitis in dairy cows ». *Journal of Dairy Science* 93 (2): 582-592. doi:10.3168/jds.2009-2445.
- Knap, P.W. 2005. « Breeding robust pigs ». *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45 (8): 763-773.
- Koolhaas, J.M, S.M Korte, S.F De Boer, B.J Van Der Vegt, C.G Van Reenen, H Hopster, I.C De Jong, M.A.W Ruis, et H.J Blokhuis. 1999. « Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23 (7): 925-935. doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3.
- Koolhaas, Jaap M., Sietse F. de Boer, Bauke Buwalda, et Kees van Reenen. 2007. « Individual Variation in Coping with Stress: A Multidimensional Approach of Ultimate and Proximate Mechanisms ». *Brain, Behavior and Evolution* 70 (4): 218-226. doi:10.1159/000105485.
- Laursen, Danielle Caroline, Patricia I. M. Silva, Bodil K. Larsen, et Erik Höglund. 2013. « High oxygen consumption rates and scale loss indicate elevated aggressive behaviour at low rearing density, while elevated brain serotonergic activity suggests chronic stress at high rearing densities in farmed rainbow trout ». *Physiology & Behavior* 122 (octobre): 147-154. doi:10.1016/j.physbeh.2013.08.026.
- Liebert, Anja M, et Carl B Schreck. 2006. « Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation ». *General and Comparative Endocrinology* 148 (2): 195-202. doi:10.1016/j.ygcen.2006.03.002.
- Liew, Hon Jung, Daniela Chiarella, Antonella Pelle, Caterina Faggio, Ronny Blust, et Gudrun De Boeck. 2013. « Cortisol emphasizes the metabolic strategies employed by common carp, *Cyprinus carpio* at different feeding and swimming regimes ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166 (3): 449-464. doi:10.1016/j.cbpa.2013.07.029.
- McDonald, G., et L. Milligan. 1997. « Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress ». *Fish stress and health in aquaculture* 62: 119-145.
- McKenzie, D. J., E. Höglund, A. Dupont-Prinet, B. K. Larsen, P. V. Skov, P. B. Pedersen, et A. Jokumsen. 2012. « Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout ». *Aquaculture* 338-341 (mars): 216-222. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.01.020.
- Morgan, John D., et George K. Iwama. 1996. « Cortisol-Induced Changes in Oxygen Consumption and Ionic Regulation in Coastal Cutthroat Trout (*Oncorhynchus Clarki* Clarki) Parr ». *Fish Physiology and Biochemistry* 15 (5): 385-394. doi:10.1007/BF01875581.

- Nakamura, Fumio. 1986. « Avoidance Behavior and Swimming Activity of Fish to Detect pH Changes ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 37 (1): 808-815. doi:10.1007/BF01607843.
- Napel, J. ten, F. Bianchi, et Monique Bestman. 2006. « Utilising intrinsic robustness in agricultural production systems: Inventions for a sustainable development of agriculture ». In *TransForum Agro & Groen*. <http://core.kmi.open.ac.uk/display/10929438>.
- Nielsen, H. M., I. Olesen, S. Navrud, K. Kolstad, et P. Amer. 2011. « How to Consider the Value of Farm Animals in Breeding Goals. A Review of Current Status and Future Challenges ». *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 24 (4): 309-330. doi:10.1007/s10806-010-9264-4.
- Olla, Bori L., et Anne L. Studholme. 1971. « The Effect of Temperature on the Activity of Bluefish, *Pomatomus Saltatrix* L ». *The Biological Bulletin* 141 (2): 337-349.
- Øverli, Øyvind, Tom G. Pottinger, Toby R. Carrick, Elisabeth Øverli, et Svante Winberg. 2002. « Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness ». *Journal of Experimental Biology* 205 (3): 391 -395.
- Øverli, Øyvind, Svante Winberg, et Tom G. Pottinger. 2005. « Behavioral and Neuroendocrine Correlates of Selection for Stress Responsiveness in Rainbow Trout—a Review ». *Integrative and Comparative Biology* 45 (3): 463 -474. doi:10.1093/icb/45.3.463.
- Parker, A. J., G. P. Hamlin, C. J. Coleman, et L. A. Fitzpatrick. 2003. « Dehydration in Stressed Ruminants May Be the Result of Acortisol-Induced Diuresis ». *Journal of Animal Science* 81 (2): 512-519.
- Pike, Thomas W, Madhumita Samanta, Jan Lindstrom, et Nick J Royle. 2008. « Behavioural phenotype affects social interactions in an animal network ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275 (1650): 2515-2520. doi:10.1098/rspb.2008.0744.
- Pottinger, T. G., et E. Mosuwe. 1994. « The Corticosteroidogenic Response of Brown and Rainbow Trout Alevins and Fry to Environmental Stress during a “Critical Period” ». *General and Comparative Endocrinology* 95 (3): 350-362. doi:10.1006/gcen.1994.1133.
- Pottinger, T.G., et T.R. Carrick. 1999. « Modification of the Plasma Cortisol Response to Stress in Rainbow Trout by Selective Breeding ». *General and Comparative Endocrinology* 116 (1): 122-132. doi:10.1006/gcen.1999.7355.
- Quillet, E., F. Krieg, N. Dechamp, C. Hervet, A. Bérard, P. Le Roy, R. Guyomard, P. Prunet, et T. G. Pottinger. 2014. « Quantitative Trait Loci for Magnitude of the Plasma Cortisol Response to Confinement in Rainbow Trout ». *Animal Genetics*, n/a-n/a. doi:10.1111/age.12126.

- Ruane, N.M., S.E. Wendelaar Bonga, et P.H.M. Balm. 1999. « Differences between Rainbow Trout and Brown Trout in the Regulation of the Pituitary–Interrenal Axis and Physiological Performance during Confinement ». *General and Comparative Endocrinology* 115 (2): 210-219. doi:10.1006/gcen.1999.7292.
- Sadoul, B., P. Evouna Mengues, N. C. Friggens, P. Prunet, et V. Colson. 2014a. « A new method for measuring group behaviours of fish shoals from recorded videos taken in near aquaculture conditions ». *Aquaculture* 430 (juin): 179-187. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.008.
- Schjolden, J., K. G. T. Pulman, T. G. Pottinger, N. B. Metcalfe, et S. Winberg. 2006. « Divergence in Locomotor Activity between Two Strains of Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* with Contrasting Stress Responsiveness ». *Journal of Fish Biology* 68 (3): 920-24. doi:10.1111/j.0022-1112.2006.00935.x.
- Schjolden, Joachim, Tobias Backström, Kim G.T. Pulman, Tom G. Pottinger, et Svante Winberg. 2005. « Divergence in behavioural responses to stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with contrasting stress responsiveness ». *Hormones and Behavior* 48 (5): 537-544. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.04.008.
- Scott, Alexander P., et Tim Ellis. 2007. « Measurement of Fish Steroids in Water - a Review ». *General and Comparative Endocrinology* 153 (1-3): 392-400. doi:10.1016/j.ygcen.2006.11.006.
- Trenzado, C. E., T. R. Carrick, et T. G. Pottinger. 2003. « Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress ». *General and Comparative Endocrinology* 133 (3): 332-340. doi:10.1016/S0016-6480(03)00191-6.
- Wingfield, John C. 2013. « The comparative biology of environmental stress: behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments ». *Animal Behaviour* 85 (5): 1127-1133. doi:10.1016/j.anbehav.2013.02.018.

CHAPITRE 3

Etude de la variabilité des réponses adaptatives dans une expérience d'hypercapnie

Nous avons montré dans le chapitre 2 des différences de capacité adaptative lors d'un challenge de confinement entre les lignées isogéniques A et R de truites arc-en-ciel. Nous avons cherché à savoir si ces différences étaient constantes entre perturbations. Est-ce qu'une lignée caractérisée comme robuste pour une perturbation l'est également pour une autre perturbation? L'expérience du chapitre 2 a donc été réitérée avec un autre challenge sur des juvéniles issus d'une nouvelle fécondation. Ainsi, les poissons ont été soumis à un challenge d'hypercapnie, consistant à augmenter la concentration de dioxyde de carbone dans l'eau. Il s'agit d'un problème ayant souvent été rencontré en élevages piscicoles équipés de systèmes en eau recirculée (Hu et al., 2011; Isla Molleda, 2008) avec notamment des effets sur la santé, la croissance et la résistance aux maladies des poissons (Good et al., 2010; Huchzermeyer, 2003; Ishimatsu et al., 2005; Santos et al., 2013; Thomas et al., 1983).

De la même façon que pour l'expérience du chapitre 2, les lignées isogéniques A et R ont été suivies avant, pendant et après un stress d'hypercapnie de 4 heures. La concentration de CO₂ dans l'eau des bacs expérimentaux a, durant le challenge, été multipliée par quatre. Les mesures non invasives décrites dans le chapitre 1 ont été réalisées afin de décrire la résistance au challenge et la capacité à récupérer des deux lignées. Ces mesures (cortisol dans l'eau, consommation d'oxygène et comportement) ont été réalisées sur les mêmes aquariums au cours du temps.

Comme pour le confinement, l'ensemble des mesures a été affectée par la perturbation, avec une augmentation significative du cortisol dans l'eau et des index comportementaux, et une diminution significative de la consommation en dioxygène. Cependant, les mesures de cortisol dans l'eau ainsi que les résultats comportementaux ont montré une acclimatation des individus au challenge avec un retour à l'état initial avant la fin de la perturbation. Nous avons également observé une réponse de l'axe corticotrope plus importante chez la lignée R avec un niveau de cortisol dans l'eau plus élevé que chez la lignée A. Ces résultats vont dans le sens opposé aux conclusions proposées suite à l'expérience de confinement qui décrivaient la lignée R comme plus résistante que la lignée A aux perturbations environnementales. Il semblerait que la résistance et donc indirectement la robustesse telle que nous la définissons, soient perturbation-dépendantes.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article en préparation (article 3 ci-après).

Physiological and behavioral responses to an acute CO₂ challenge in isogenic lines of rainbow trout.

B. Sadoul^{1*}, C. Valotaire¹, I. Leguen¹, Laurent Labbé², V. Colson¹, N.C. Friggens^{3,4}, P. Prunet¹

¹ INRA, LPGP Fish Physiology and Genomics UR1037, Rennes, France

² INRA, UE937 Pisciculture expérimentale des Monts d'Arrée, F- 29450 Sizun, France

³ INRA, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

⁴ AgroParisTech, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

*Corresponding author. Email address: bsadoul@rennes.inra.fr. Phone number: +332.23.48.50.36

1. Introduction

Sudden environmental change triggers a complex series of adaptive responses in biological organisms (Romero, 2004; Selye, 1976). Behavioral, metabolic and neuroendocrine responses are the first lines of defense against an abiotic or a biotic threat in animals. Studying these responses in a biological system facing an acute environmental perturbation may provide important indications on the robustness of the system (Wingfield, 2013), and more especially on its sensitivity and ability to recover from an acute stressor. Animals are frequently affected by acute stressors in nature or rearing conditions. These stressors can affect health and welfare of animals constantly triggering important adaptive responses. Therefore, resistance and recovery capacities are increasingly important robustness traits for animal production, especially given the societal pressure for welfare and environmentally friendly production.

In aquaculture, fish face very diverse acute perturbation types. Physical perturbations defined as being life-threatening can be encountered with, for example, sudden increase in CO₂ concentration or disease pressure, decrease in O₂ concentration or modification of temperature or salinity. In parallel, other perturbations defined as psychological can also frequently affect fish during for example tank cleaning, confinement, handling or other rearing practices (Ashley, 2007; Conte, 2004). Ideally, robust animals are robust for all types of perturbations. However, for some authors, increased robustness facing one challenge is paid for by an equal increase in fragility facing another challenge (Csete and Doyle, 2002; Kitano, 2007). These

hypotheses are driven by the development of models for studying complexity in systems, and arguing that the successive layers of regulation driven by evolution increases robustness for specific perturbations in biological systems, but necessarily increases fragility with unexpected perturbations (Carlson and Doyle, 2002). This trade-off hypothesis considers that selection during evolution has favored animals that were specialized in facing environmental perturbations they frequently encounter, but in detriment of lower capacities in facing other perturbations. In this optic, it seems likely that selection in breeding programs has favored the ability of animals to be robust to some specific perturbations only, those that are relatively frequent in livestock systems.

A previous study on isogenic lines of rainbow trout has shown a genetic basis for some underlying features of robustness when facing an acute confinement challenge, which is similar to a netting challenge (Sadoul et al., 2014b). By comparing two isogenic lines, the study demonstrated the increased resistance of one line to this psychological perturbation. In the present study, based on the trade-off hypothesis outlined above, we tested whether the difference in resistance remained consistent over different types of challenges, by studying the reactivity of the same two isogenic lines when facing an acute increase in CO₂ in the water also called hypercapnia challenge. This physical perturbation has often been observed in recirculating aquaculture systems developed in the last decades to reduce water use (Summerfelt and Sharrer, 2004; Summerfelt et al., 2000). The chronic effect of hypercapnia is now well documented in fish, with consequences observed on growth, food intake and body condition (Fivelstad et al., 1999, 2003; Good et al., 2010; Hosfeld et al., 2008). The limited data available on the short term effect of carbon dioxide also show strong stress-related responses with increased plasma catecholamines or cortisol (Perry and Gilmour, 2002; Petochi et al., 2011). Hypercapnia can therefore be considered as a highly stressful challenge for fish and a good challenge for studying the adaptive capacities in fish and providing information on its robustness.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical statements

Experiments were conducted within INRA facilities having authorization for animal experimentation (B29-777-02). Fish used in the experiment were reared and handled in strict accordance with French and European policies and guidelines of the INRA PEIMA Institutional Animal Care and Use Committee (which agreement number is B29-777-02).

2.2. Isogenic lines

Two isogenic lines of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, were produced by crossing two fully homozygous but different sires (A22 and R23) with two homozygous females both from the same isogenic line (genetically identical females, B57) (Quillet et al., 2007). The resulting individuals were therefore heterozygous A22-B57 and R23-B57 (respectively referred to as A and R in the rest of the text). To avoid any bias due to maternal effects, females spawning the same day were used. The ova were mixed and redistributed in two batches, each being fertilized the same day by one male. Thus, the between-line differences were expected to be genetic only. Both lines have been previously characterized for their adaptation to a plant-based diet challenge (Geurden et al., 2013) and for their resistance and recovery capacities when facing an acute confinement challenge (Sadoul et al., 2014b)

Fish of both lines were reared in the same conditions and using the same commercial diet. Fertilized eggs were incubated at 11.4 °C. At eyed stage, each isogenic line was reared in a 0.25 m³ tank supplied with natural spring water (11.4 °C, CO₂ concentrations fluctuating between 8-15 mg/L) until experiment.

2.3. Experimental design

The experiment was carried out in two replicates three weeks apart. Within each replicate, both lines were used.

2.3.1. Acclimation to experimental aquaria

At a mean weight of about 1.8g, 16 fish of one line, having similar size, were placed in a 1.7L aquarium (total fish weight per aquarium: 28.6 ± 0.5 g) for a 2 weeks acclimation time. For each line, 4 identical aquaria were used. All aquaria were supplied with the same water flow at a CO₂ concentration of 10 mg/L, and were visually observed using two cameras placed above. They were also equipped with a small closed external water circuit taking water on one side of the aquaria and bringing it back on the other side. This system allowed, when needed, continuous measures of O₂ concentrations using flow-through oxygen sensors linked to a multi-channel fiber optic oxygen transmitter (oxy-4 mini from PreSens, Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany). The system also allowed water sampling (450mL) at given time points.

After two days of acclimation, fish ate again and were hand-fed with the same commercial diet as during rearing.

2.3.2. Hypercapnia protocol and samples collection

The experiment consisted of a hypercapnia challenge of 4 hours duration with measurements at 8 time points, before, during and after the challenge (see Figure 29). The hypercapnia challenge consisted in rapidly multiplying by four the CO₂ concentration in the aquaria. The CO₂ increase was conducted by suddenly supplying CO₂ enriched water at a concentration of around 40mg/L (see Figure 30 for more details) instead of the initial water. The enriched water was obtained by injecting a constant flow from a liquid CO₂ cylinder. Values of CO₂ concentration and pH were followed during the whole experiment in a parallel aquarium without fish but treated like all other aquaria. The kinetics of CO₂ concentrations and pH are shown in Figure 30 and Figure 31 respectively. At each time point, video recording, water sampling and oxygen measures were performed for further analysis as detailed below.

2.3.3. Replicate

The second replicate used naïve fish from the same fecundation, and weighting about 3.2g. To keep a density similar to the first experiment, only 12 fish were placed per aquarium of 2.3 L (total fish weight per aquarium: 39.7 ± 0.7 g).

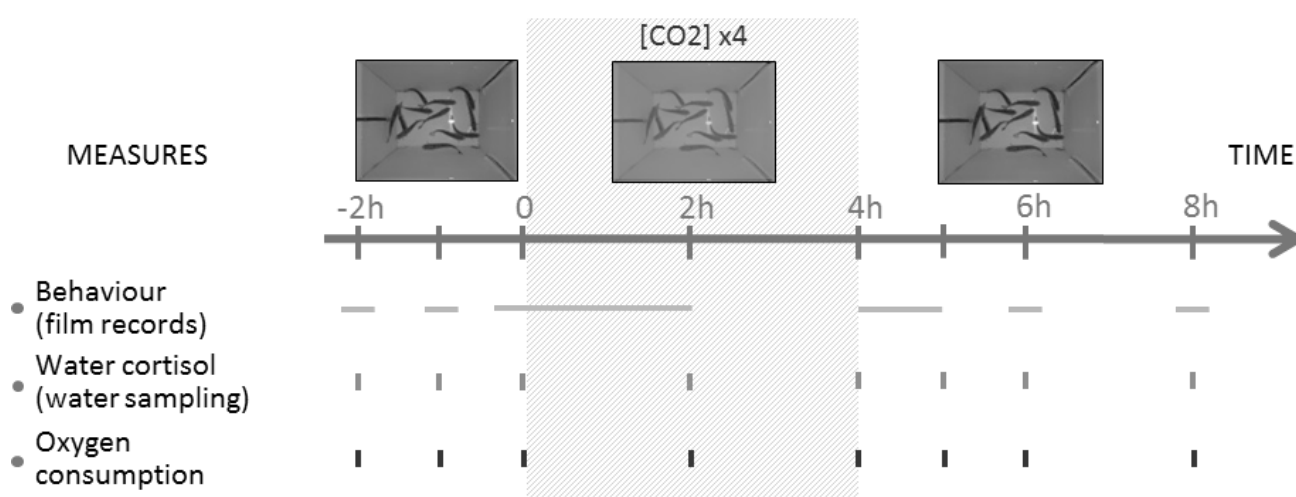


Figure 29. Design of the hypercapnia experiment over time.

Aquaria were analyzed for behavior, cortisol release rate and oxygen consumption before, during and after a hypercapnia challenge (shaded rectangle). Each horizontal line represents a video recording taken by camera placed above the aquaria. Vertical lines correspond to the water sampling points and the oxygen consumption measurements. At time 0, a 4-hour hypercapnia challenge is performed by suddenly multiplying by 4 the CO₂ concentration in the water.

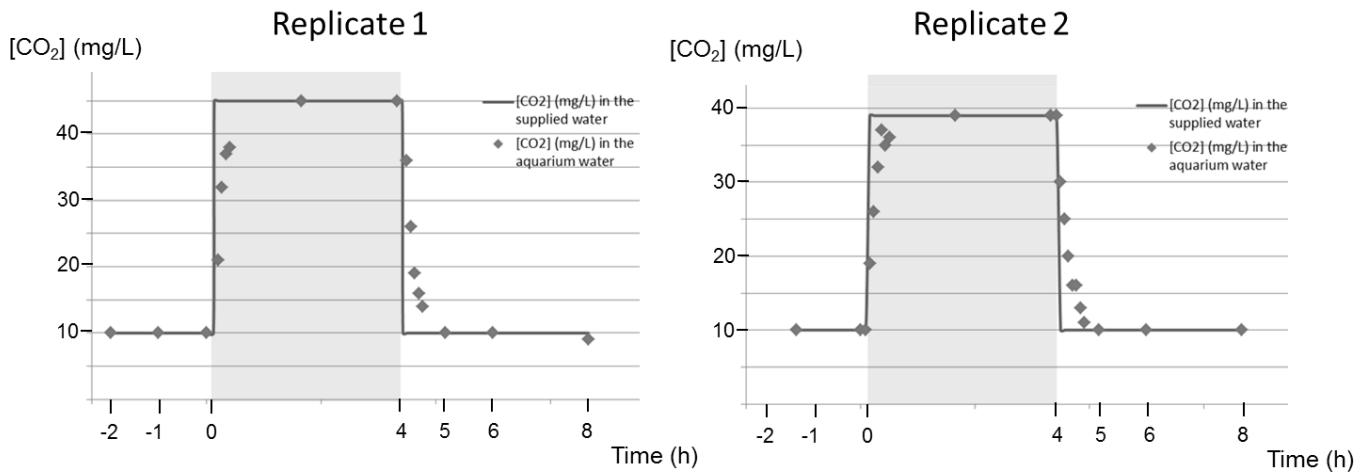


Figure 30. CO₂ concentration in the supplied water (full line) and in the test aquarium (points) during the two replicates of a hypercapnia experiment (shaded rectangle).

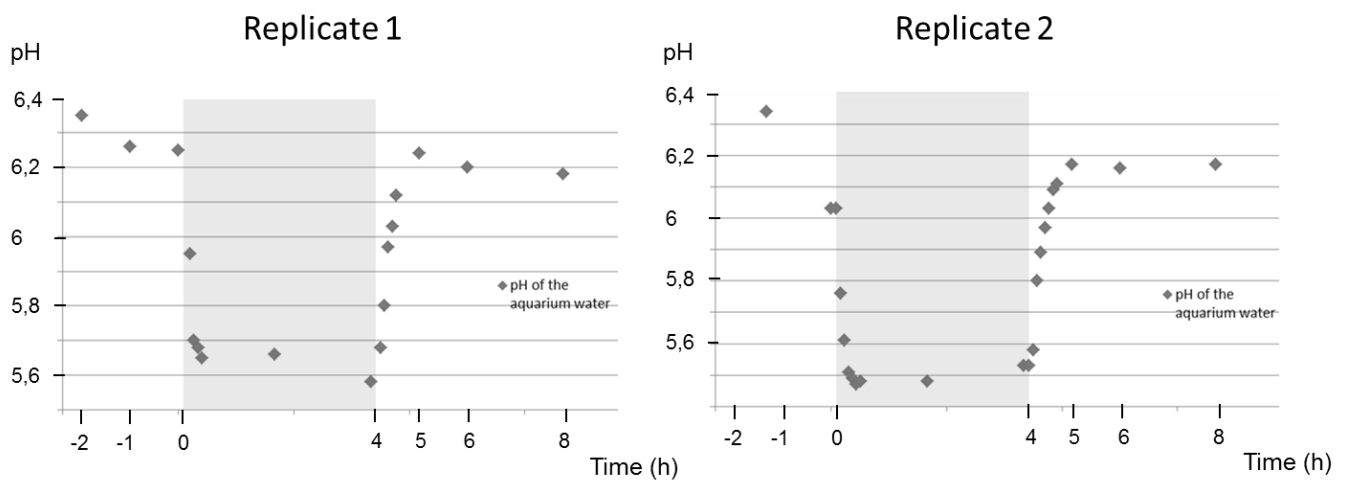


Figure 31. pH in the test aquarium during the two replicates of a hypercapnia experiment (shaded rectangle).

2.4. Sample analysis

2.4.1. Group behavior measurements

Two group behavior indexes were calculated from the video using the method developed by Sadoul et al. (Sadoul et al., 2014a). These group behavior indexes translate group dispersion of the shoal in the aquarium and group swimming activity. The method gives a value for both indexes every half second of the video. We summarized these data by calculating the mean for each index and aquarium per 15 minutes.

In addition, in each aquarium, aggressive acts were counted for the 3x15 minutes of video recordings before the hypercapnia challenge. An aggressive act was defined as a bite of one individual on another or as a bite attempt with chase.

2.4.2. Oxygen consumption rate

Oxygen consumption rate in each aquarium (MO_2 , $\text{mgO}_2/\text{kg/h}$) was measured by using the experimental aquaria as open respirometers. Oxygen concentration (mg/L) was assessed every second using 2 calibrated multi-channel fiber optic oxygen transmitters Oxy-4 mini from Presens. Water supply within the aquaria was stopped during 8 minutes to measure oxygen uptake. Oxygen concentration decreased at a rate equal to the aquarium oxygen consumption. This data was corrected for total fish weight in each aquarium to obtain oxygen consumption per kg of fish.

2.4.3. Cortisol release rate

Corticosteroids were extracted from water samples using a method adapted by Greenwood et al. (Greenwood et al., 2001) and Ellis et al. (Ellis et al., 2004b). Briefly, water samples were filtered by gravity through a nylon filter (100 μm pore-size). Samples were then peristaltically pumped at about 25ml/min through successive filters (2 of 11 μm , 1 of 2.5 μm and 1 of 0.45 μm pore-size) and then through an activated solid phase extraction cartridge (Sep-pak® Plus C18, Waters Ltd., U.K.). Approximately 400 mL were processed per sample with the actual volume determined using a graduated test-tube. After pumping, corticosteroids were immediately retrieved from the cartridge by elution with 5mL of organic solvent (ethylacetate/cyclohexane, 1/1 vol/vol). Eluate was then frozen at -20°C overnight, transferred to a fresh tube to conserve only the organic phase and evaporated at 40°C. Corticosteroids

were then re-dissolved in 200µl of ethanol and stored at -20°C. Cartridges were reused after reactivation up to 5 times. No effect of the reuse was observed.

Cortisol measurements from water were carried out using a RIA procedure as previously described by (Auperin et al., 1997).

2.5. Data analysis

The analyses were carried out using the free software R 2.14.0 (<http://cran.r-project.org/>).

Behavior, cortisol release rate and oxygen consumption data were obtained as repeated measures on the same aquaria over time.

2.5.1. Testing time, line and replicate effects on all measures

The data were analyzed using the following complete linear mixed model:

$$Y_{ijkl} = \mu + time_i + line_j + replicate_k + time_i:line_j + replicate_k:time_i + replicate_k:line_j + replicate_k:time_i:line_j + aquaria_l + \varepsilon_{ijkl}$$

With Y_{ijkl} , the value of $line_j$ for $replicate_k$ within $aquarium_l$ at $timepoint_i$ (discrete) and ε_{ijkl} the associated residual. Time was fit as discrete variable with a mean estimated for each time point independently. Aquarium was fit as a random variable assuming a mean of 0 and a normal distribution.

Non-significant effects were withdrawn and the model was run again until only significant effects remain in the model. The effect of the challenge was then tested by comparing the mean of the three points before the challenge to the points during or after the challenge, using contrasts based on the linear combination of the final model parameters.

2.5.2. Recovery and amplitude response estimations per aquarium

Variations between individual aquaria were further analyzed to explore correlations between behavioral and physiological responses. Individual variation in amplitude of the response data was obtained using the following procedure:

Extract of the residuals from the general response by fitting the following linear model to the time points between 0 and 4 hours:

$$Y_{ikl} = \mu + time_i + replicate_k + replicate_k:time_i + \varepsilon_{ikl}$$

With Y_{ikl} , the value of replicate_k for aquarium_l at timepoint_i (discrete) and ε_{ikl} associated residual.

Fit the following linear regression on the residuals assumed to have a linear trend with respect to the time:

$$\varepsilon_{il} = \mu + aquaria_l + a_l * aquaria_l : timeq + \varepsilon_{il}$$

With timeq being time, fit as a continuous variable.

The value of the slope of this model (a_l) gives an estimation of the relative amplitude of the response for one aquarium and one measure compared to the mean. Aquaria showing a high a_l in the amplitude of the response analysis are considered as more sensitive aquaria than the mean.

The same was performed for the recovery response with time points between 4 and 8 hours. Aquaria showing very negative a_l in the recovery analysis presented better recovery capacities than the mean.

The relationships between amplitude and recovery variability across measures were explored using Principal Component Analysis (PCA), to reveal relationships between all measurements (physiology and behavior measures) and observations (aquaria). PCA was performed using data from recovery and amplitude of cortisol release rate, oxygen consumption, dispersion index and activity index. The data were all scaled to mean 0 and standard deviation 1.

3. Results

3.1. The effect of hypercapnia on the physiological and behavioral data

Means per time point and line of the repeated measures data are presented in Figure 32. This includes the following parameters: cortisol release, oxygen consumption, dispersion index and swimming activity index. All the time points during and after the challenge were statistically compared individually to the mean of the time points before the challenge (Figure 32 and Table 6).

There was a significant effect of time on all physiological and behavioral measures (at least on timepoint during the challenge with $p\text{-value} < 0.05$), indicating that all were impacted by the hypercapnia. Indeed, cortisol release rate increased significantly during the challenge for both lines ($p\text{-value} < 0.001$). Similarly, oxygen consumption rate was significantly affected by

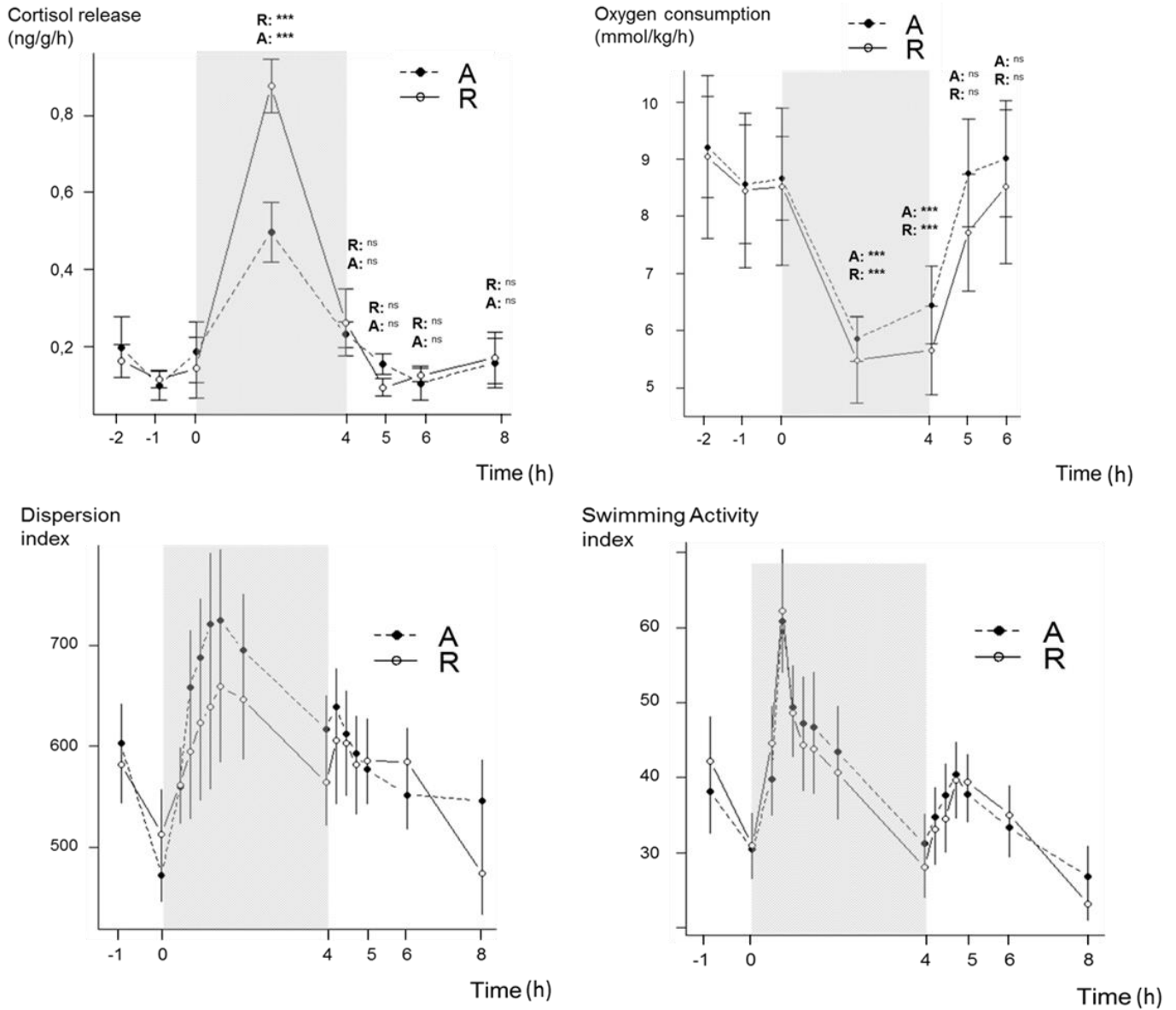


Figure 32. Impact of a hypercapnia challenge on repeated measures of physiological and behavioural measures in two isogenic lines (A and R) of rainbow trout.

Each time-point during and after hypercapnia is compared to the mean of the pre-challenge time points in each isogenic line. Results for the dispersion and swimming activity indexes are given in Table 6. A significant difference is noted * (p-value<0.05), ** (p-value<0.01) or *** (p-value<0.001).

Table 6. Significant differences between the time points (in hours) in the behavioral temporal pattern (figure 4) compared to the mean of the pre-challenge time points.

A significant difference is noted * (p-value<0.05), ** (p-value<0.01) or *** (p-value<0.001). A tendency is noted . (p-value<0.1).

		Hypercapnia Challenge						Recovery					
		¼ h	½ h	¾ h	1h	2h	4h	4h ¼	4h ½	4h ¾	5	6	8
Swimming activity	A	ns	***	***	*	ns	***	***	*	ns	ns	***	***
	R	ns	***	***	*	ns	***	***	*	ns	ns	***	***
Group dispersion	A	ns	**	***	***	***	ns	.	ns	ns	ns	ns	ns
	R	ns	ns	ns	.	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*

the challenge for both lines, with a significant decrease after 2 hours of hypercapnia (p -value <0.001). The swimming activity index was affected by the challenge with a significant increase at 1/2 hours after the start of the challenge. The dispersion index was also affected in with a significant increase both lines after 2 hours of hypercapnia.

The measures of cortisol and behavior showed a significant decrease during the challenge with values nearly back to initial values after 4 hours of challenge in both lines. The swimming activity index displays a significant smaller activity compared to the pre-challenge period.

3.2. Multivariate analysis and variability between aquaria

A PCA was performed on amplitude and recovery characteristics of all repeated measures expressed relative to the overall mean amplitude and recovery for each measure i.e. characterizing the variability between aquaria. Figure 33 shows the first two principal components that together accounted for 60% of the total variance. Variables that are close together are highly positively correlated (Figure 33). The ones that are opposed are negatively correlated.

Recovery variables were found to be opposed to amplitude variables for both the oxygen consumption and the cortisol release rate, i.e. these variables are negatively correlated. In contrast, the behavioral variables showed positive correlations between amplitude of the response and recovery rate.

The first principal component was mainly defined by physiological variables (oxygen consumption and cortisol release rate). Aquaria separated on this axis (Figure 33b) therefore show divergent physiological reactions to the challenge. The second component of the PCA differentiated variables into behavioral recoveries and behavioral amplitudes (swimming activity and dispersion index). Aquaria separated on this axis (Figure 33b) show therefore divergent behavioral reactions to the challenge. This variable plot shows that behavioral and physiological variables are to a large extent orthogonal in terms of explaining variability in responses.

Confidence ellipses around the two lines in the individual plot (Figure 33b) show that both lines display a similar variability for behavior traits. However, for physiological traits, line R was found to be much more variable than line A. The two isogenic lines did not differ much

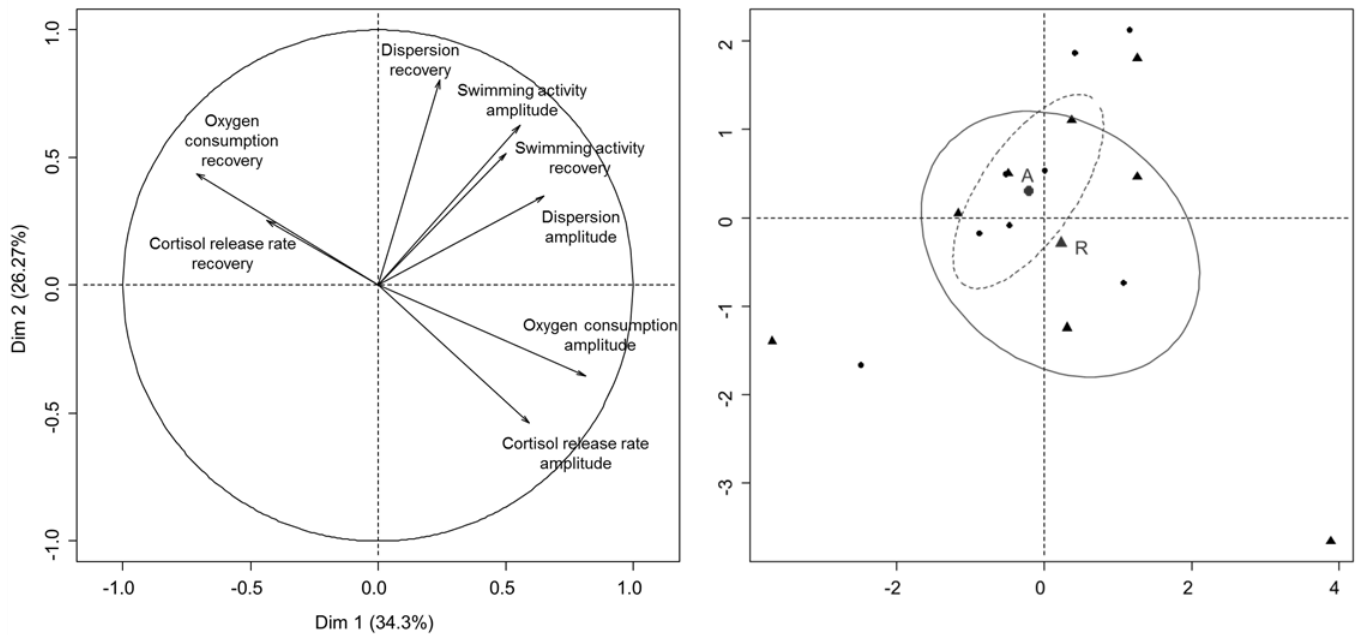


Figure 33. Principal Component Analysis (PCA) of variability in physiological and behavioral amplitudes and recoveries in a hypercapnia experiment for two isogenic lines of rainbow trout (A and R).

The origin of the coordinate system represents the mean physiological and behavioral responses and recoveries for each measure (across lines). PCA loadings (left graph) and scores (right graph) plots are displayed for principal components 1 and 2 (respectively Dim 1 and Dim 2) of the analysis. On the left graph, arrow heads indicate the loadings for each of the variables taken into account for the analysis. Opposed variables are negatively correlated and orthogonal variables weakly correlated. On the right graph, dark points and dark triangles differentiate respectively A and R aquaria. Ellipse around the mean of A (red point) and R (red triangle) represents the confidence ellipse of each isogenic line.

on the first and second components indicating that both lines had, on average, the same behavioral and physiological response to the challenge.

3.3. Number of aggressions before the hypercapnia stress and correlation with cortisol release rate response

Considerable variability in aggressiveness before the challenge between aquaria was observed. Line A was found to be significantly more aggressive than line R (Figure 34). No correlation was found between cortisol release rate response and number of aggressions before the hypercapnia stress (data not shown).

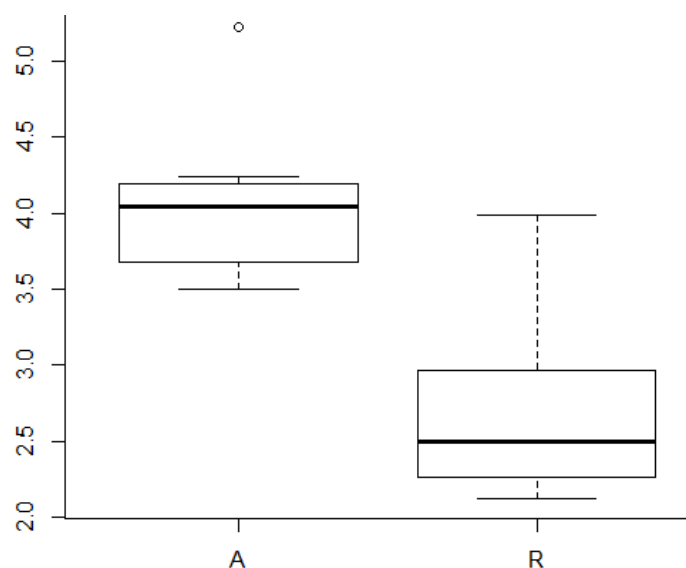


Figure 34. Number of aggressions per minute before the hypercapnia stress in lines A and R.

The aggression number were significantly different between the two lines (t-test, p-value<0.001).

4. Discussion

In this study, effects of an acute stressor were examined in two isogenic lines. Perturbations in physiological and behavioral responses were observed and gave indications on the degree of perturbation of the two lines. Using an individual analysis followed by a multivariate analysis, this study contributes to the characterization of underlying components of robustness in fish.

4.1. Effect of hypercapnia on physiological and behavioral temporal patterns

Cortisol is commonly used as a physiological indicator of stress during the first hours of an environmental perturbation (Bonga, 1997). Some studies have shown a significant increase of

serum cortisol after 3 or 4 hours of hypercapnia in sturgeon or sea bass (Crocker et al., 2000; Petochi et al., 2011). The cortisol concentrations remain usually high during several days of hypercapnia in sea bass and atlantic salmon (Fivelstad et al., 1999; Petochi et al., 2011). In our study, cortisol release increased strongly until 2 hours, then results show a quick decrease in cortisol release during the last 2 hours of the 4-hours challenge. These results suggest either a quick decrease in branchial diffusion during the challenge or a quick diminution of the stress status of the fish.

Our results also show a strong behavioral modification due to the hypercapnia challenge with a rapid increase in swimming activity and group. A similar increase in activity was observed during an hypoxic challenge in rainbow trout (van Raaij et al., 1996). In that study, individuals showing a lower activity during the challenge were found to be better able to cope with it. In Our results also show a strong behavioral modification due to the hypercapnia challenge with a rapid increase in swimming activity and group. A similar increase in activity was observed during an hypoxic challenge in rainbow trout (van Raaij et al., 1996). In that study, individuals showing a lower activity during the challenge were found to be better able to cope with it. In our study, the two lines quickly returned to initial values and even below for the activity during the challenge indicating a probable good ability to cope with the challenge. Fish displayed a quick new increase in activity and to a lesser extend in dispersion after the end of the challenge to return to initial behavior values.

This trend was clearer in swimming activity compared to group dispersion, indicating that swimming activity is a more sensible indicator of stress responses than group dispersion. Globally, these results suggest a good ability of the two lines to cope with the hypercapnia challenge. These results are therefore in opposition with the hypothesis we had, that hypercapnia would be a strong environmental perturbation and that both lines would be strongly affected.

Environmental hypercapnia decreases blood pH in fish (Thomas et al., 1983), reviewed in (Gilmour, 2001) lowering hemoglobin's affinity and carrying capacity for oxygen (Berenbrink, 2000; Malapert et al., 1997). To cope with this phenomenon called, the Root effect, many species show a strong increase in ventilation rate and volume (Kinkead and Perry, 1991; McKenzie et al., 2002; Perry and Gilmour, 2002; Tzaneva et al., 2011). Thus, hypercapnia has rarely been found to affect oxygen uptake and some studies even observed a transient increase in oxygen consumption (Graham et al., 1990; Thomas et al., 1983). Our

results showing a decrease in the oxygen uptake during the challenge are therefore in contrast with this literature. To our knowledge, only one article has shown a decrease in oxygen uptake during an acute hypercapnia challenge (Cruz-Neto and Steffensen, 1997). Our study differs from the cited studies in the technique used to measure the oxygen uptake. In contrast, to other studies using closed respirometer, we used the aquaria as open respirometers potentially allowing the fish to gasp for air at the surface. This may have contributed to the difference in O₂ uptake relative to other studies.

4.2. Within and between line variability

Both lines showed behavioral and physiological modifications in response to the challenge. However, by looking at each aquarium individually, important within line variabilities were found relative to the mean responses. The PCA analysis highlighted two axis of variability of the responses, one linked to physiological responses, the other to behavioral responses. These two orthogonal axes translate two different strategies to face the challenge. Aquariums differed from the mean either through their behavioral responses or their physiological responses. Interestingly this independence in the strategies was identical to the one found during the confinement challenge performed on the two lines in a previous study (Sadoul et al., 2014b). However, in contrast to the previous study, the variability on the physiological axis was not explained in the present study by the pre-challenge social environment. These results suggest that the pre-challenge social environment plays a more important role in a social stress (confinement) than in a physiological stress (hypercapnia).

Similarly to the previous study on confinement, the important within line variability was remarkable given the isogenic nature of the fish and the common raising environment. Despite our strong effort to control environmental conditions, these variations are probably mainly due to between aquarium effect during acclimation time and point out the importance of life history and environmental impact on stress responses even during very short period of time, i.e. 2 weeks of acclimation in the present study.

The two lines did not strongly differ in their amplitude of response or their recovery capacities. These results are probably due to the acclimation capacities of the two lines that showed a strong recovery during the challenge. The same experiment but ending after 2 hours would have probably shown divergences in the amplitude of responses with line R showing a stronger amplitude than line A for cortisol release rate.

4.3. The trade-off hypothesis for robustness

In the previous study, the two lines were found to be highly divergent for their capacity to face a confinement challenge, with line R declared more robust than line A (Sadoul et al., 2014b). These conclusions were driven by the strong amplitude of the physiological responses and the important variability in all responses for line A. In the present study, the two lines showed similar responses to the hypercapnia challenge. However, the variability analysis displayed a much stronger diversity of responses for line R. This suggest that line R was less robust to the hypercapnia than line A. These results argue therefore for the trade-off hypothesis of robustness proposed by previous authors (Kitano, 2007).

References

- Ashley, Paul J. 2007. « Fish welfare: Current issues in aquaculture ». *Applied Animal Behaviour Science* 104 (3–4): 199–235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001.
- Auperin, B., J.F. Baroiller, M.J. Ricordel, A. Fostier, et P. Prunet. 1997. « Effect of Confinement Stress on Circulating Levels of Growth Hormone and Two Prolactins in Freshwater-Adapted Tilapia (*Oreochromis niloticus*) ». *General and Comparative Endocrinology* 108 (1): 35–44. doi:10.1006/gcen.1997.6938.
- Berenbrink, M. 2000. « Haemoglobin function and the evolution of adrenoresponses in lower vertebrates ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 126, Supplement 1 (juillet): S10. doi:10.1016/S0305-0491(00)80019-X.
- Bonga, S. E. Wendelaar. 1997. « The Stress Response in Fish ». *Physiological Reviews* 77 (3): 591–625.
- Carlson, J. M., et John Doyle. 2002. « Complexity and Robustness ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 Suppl 1 (février): 2538–45. doi:10.1073/pnas.012582499.
- Conte, F.S. 2004. « Stress and the welfare of cultured fish ». *Applied Animal Behaviour Science* 86 (3–4): 205–23. doi:10.1016/j.applanim.2004.02.003.
- Crocker, Carlos E., Anthony P. Farrell, A. Kurt Gamperl, et Jr Joseph J. Cech. 2000. « Cardiorespiratory Responses of White Sturgeon to Environmental Hypercapnia ». *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279 (2): R617–28.

- Cruz-Neto, A. P., et J. F. Steffensen. 1997. « The Effects of Acute Hypoxia and Hypercapnia on Oxygen Consumption of the Freshwater European Eel ». *Journal of Fish Biology* 50 (4): 759-69. doi:10.1111/j.1095-8649.1997.tb01970.x.
- Csete, Marie E., et John C. Doyle. 2002. « Reverse Engineering of Biological Complexity ». *Science* 295 (5560): 1664-69. doi:10.1126/science.1069981.
- Ellis, T, JD James, C Stewart, et AP Scott. 2004. « A Non-Invasive Stress Assay Based upon Measurement of Free Cortisol Released into the Water by Rainbow Trout ». *Journal of Fish Biology* 65 (5): 1233-52. doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00499.x.
- Fivelstad, Sveinung, Anne Berit Olsen, Torbjørn Åsgård, Grete Baeverfjord, Tim Rasmussen, Tore Vindheim, et Sigurd Stefansson. 2003. « Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters ». *Aquaculture* 215 (1-4): 301-19. doi:10.1016/S0044-8486(02)00048-0.
- Fivelstad, Sveinung, Anne Berit Olsen, Hilde Kløften, Hanne Ski, et Sigurd Stefansson. 1999. « Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater ». *Aquaculture* 178 (1-2): 171-87. doi:10.1016/S0044-8486(99)00125-8.
- Geurden, Inge, Peter Borchert, Mukundh N. Balasubramanian, Johan W. Schrama, Mathilde Dupont-Nivet, Edwige Quillet, Sadasivam J. Kaushik, Stéphane Panserat, et Françoise Médale. 2013. « The Positive Impact of the Early-Feeding of a Plant-Based Diet on Its Future Acceptance and Utilisation in Rainbow Trout ». *PLoS ONE* 8 (12): e83162. doi:10.1371/journal.pone.0083162.
- Gilmour, Kathleen M. 2001. « The CO₂/pH ventilatory drive in fish ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130 (2): 219-40. doi:10.1016/S1095-6433(01)00391-9.
- Good, Christopher, John Davidson, Carla Welsh, Kevin Snekvik, et Steven Summerfelt. 2010. « The effects of carbon dioxide on performance and histopathology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in water recirculation aquaculture systems ». *Aquacultural Engineering* 42 (2): 51-56. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.11.001.
- Graham, M. S., J. D. Turner, et C. M. Wood. 1990. « Control of ventilation in the hypercapnic skate *Raja ocellata*: I. Blood and extradural fluid ». *Respiration Physiology* 80 (2-3): 259-77. doi:10.1016/0034-5687(90)90088-G.
- Greenwood, LN, AP Scott, ELM Vermeirssen, CC Mylonas, et M Pavlidis. 2001. « Plasma Steroids in Mature Common Dentex (*Dentex Dentex*) Stimulated with a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist ». *General and Comparative Endocrinology* 123 (1): 1-12. doi:10.1006/gcen.2000.7519.

- Hosfeld, Camilla Diesen, Annhild Engevik, Ted Mollan, Torleif Markussen Lunde, Rune Waagbø, Anne Berit Olsen, Olav Breck, Sigurd Stefansson, et Sveinung Fivelstad. 2008. « Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts ». *Aquaculture* 280 (1–4): 146–53. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.05.009.
- Kinkead, Richard, et Steve F. Perry. 1991. « The effects of catecholamines on ventilation in rainbow trout during hypoxia or hypercapnia ». *Respiration Physiology* 84 (1): 77–92. doi:10.1016/0034-5687(91)90020-J.
- Kitano, Hiroaki. 2007. « Towards a Theory of Biological Robustness ». *Molecular Systems Biology* 3 (1): n/a – n/a. doi:10.1038/msb4100179.
- Malapert, M., H. Guizouarn, B. Fievet, R. Jahns, F. Garcia-Romeu, R. Motais, et F. Borgese. 1997. « Regulation of Na⁺/H⁺ Antiporter in Trout Red Blood Cells. » *Journal of Experimental Biology* 200 (2): 353–60.
- McKenzie, D., E. Taylor, A. Dalla Valle, et J. Steffensen. 2002. « Tolerance of Acute Hypercapnic Acidosis by the European Eel (*Anguilla Anguilla*) ». *Journal of Comparative Physiology B* 172 (4): 339–46. doi:10.1007/s00360-002-0260-5.
- Perry, Steve F., et Kathleen M. Gilmour. 2002. « Sensing and Transfer of Respiratory Gases at the Fish Gill ». *Journal of Experimental Zoology* 293 (3): 249–63. doi:10.1002/jez.10129.
- Petochi, T., P. Di Marco, A. Priori, M. G. Finoia, I. Mercatali, et G. Marino. 2011. « Coping strategy and stress response of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to acute and chronic environmental hypercapnia under hyperoxic conditions ». *Aquaculture* 315 (3–4): 312–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.02.028.
- Quillet, Edwige, Michel Dorson, Sandrine Le Guillou, Abdenour Benmansour, et Pierre Boudinot. 2007. « Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout ». *Fish & Shellfish Immunology* 22 (5): 510–19. doi:10.1016/j.fsi.2006.07.002.
- Romero, L. Michael. 2004. « Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research ». *Trends in Ecology & Evolution* 19 (5): 249–55. doi:10.1016/j.tree.2004.03.008.
- Sadoul, B., P. Evouna Mengues, N. C. Friggens, P. Prunet, et V. Colson. 2014a. « A new method for measuring group behaviours of fish shoals from recorded videos taken in near aquaculture conditions ». *Aquaculture* 430 (juin): 179–87. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.008.

- Sadoul, Bastien, Isabelle Leguen, Violaine Colson, N C Friggens, et P. Prunet. 2014b. « A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a confinement stress ».
- Selye, Hans. 1976. *The Stress of Life*. McGraw-Hill.
- Summerfelt, S. T., B. J. Vinci, et R. H. Piedrahita. 2000. « Oxygenation and carbon dioxide control in water reuse systems ». *Aquacultural Engineering* 22 (1–2): 87–108. doi:10.1016/S0144-8609(00)00034-0.
- Summerfelt, Steven T., et Mark J. Sharrer. 2004. « Design implication of carbon dioxide production within biofilters contained in recirculating salmonid culture systems ». *Aquacultural Engineering*, 2003 Aquacultural Engineering Society Issues Forum, 32 (1): 171–82. doi:10.1016/j.aquaeng.2004.03.006.
- Thomas, S., B. Fievet, L. Barthelemy, et C. Peyraud. 1983. « Comparison of the Effects of Exogenous and Endogenous Hypercapnia on Ventilation and Oxygen Uptake in the Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri* R.) ». *Journal of Comparative Physiology* 151 (2): 185–90. doi:10.1007/BF00689917.
- Tzaneva, Velislava, Kathleen M. Gilmour, et Steve F. Perry. 2011. « Respiratory responses to hypoxia or hypercapnia in goldfish (*Carassius auratus*) experiencing gill remodelling ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 175 (1): 112–20. doi:10.1016/j.resp.2010.09.018.
- Van Raaij, Marcel T.M., Djemila S.S. Pit, Paul H.M. Balm, Anton B. Steffens³, et Guido E.E.J.M. van den Thillart. 1996. « Behavioral Strategy and the Physiological Stress Response in Rainbow Trout Exposed to Severe Hypoxia ». *Hormones and Behavior* 30 (1): 85–92. doi:10.1006/hbeh.1996.0012.
- Wingfield, John C. 2013. « The comparative biology of environmental stress: behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments ». *Animal Behaviour* 85 (5): 1127–33. doi:10.1016/j.anbehav.2013.02.018.

CHAPITRE 4

Modèle pour la description des réponses adaptatives d'un système lors d'une perturbation aiguë

Nous avons utilisé dans ces deux premiers chapitres une méthode permettant de décrire et de comparer statistiquement les cinétiques de réponses entre bac et entre lignée. Cette méthode fournit des informations sur les composantes de la variabilité à partir de comparaison relative entre individu statistique. La caractérisation de la cinétique n'a donc pas d'origine explicite et ne fournit pas de données absolues sur la capacité de l'animal à faire face à la perturbation. De plus, elle nécessite de décrire la réponse en comparant indépendamment deux périodes de la cinétique qui pourtant sont étroitement liées. Créer un modèle mathématique pour décrire la cinétique peut permettre de répondre à ces problèmes.

Afin de caractériser des qualités de résistance et de capacité à récupérer du challenge, s'inspirer d'un modèle physique de ressort ou d'élastique semble rationnel. Un tel modèle permettrait également d'envisager à plus long terme de prédire et de décrire des réponses à différents types de perturbations. Ce chapitre propose donc un modèle capable de s'ajuster à des cinétiques de réponse d'animaux subissant des perturbations aiguës. Le modèle est composé d'un ressort et d'un amortisseur associés en parallèle et caractérisés respectivement par un paramètre de résistance et un paramètre d'amortissement. En situation non perturbée, le système est stable dans son état initial. Lors d'une perturbation aiguë, une force de l'environnement est ajoutée (par analogie à un poids) entraînant l'élongation du ressort. La longueur du ressort décrit la réponse du système à la perturbation. Lorsque la perturbation est terminée, le poids lié à l'environnement redevient nul et le système retourne à son état initial à une vitesse fonction du coefficient d'amortissement du système.

Ce chapitre décrit dans un premier temps les liens entre les différents paramètres du modèle, puis sa capacité à s'ajuster aux données issues du chapitre 2, c'est-à-dire aux réponses des poissons face à un challenge de confinement. Le modèle est capable de s'ajuster à des réponses dont les cinétiques sont très différentes et permet de caractériser à l'aide de données absolues la résistance et la capacité à récupérer de chacun des individus statistiques. Ce modèle semble donc être un bon modèle pour décrire des cinétiques de réponses d'un système face à une perturbation aiguë de son environnement. De futurs travaux vont consister à vérifier le caractère générique du modèle en l'ajustant à des données issues de chèvres soumises à un challenge nutritionnel aigu.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article en préparation.

On the use of a simple physical system to study robustness features in animal sciences

B. Sadoul^{1*}, O. Martin^{3,4}, P. Prunet¹, N.C. Friggens^{3,4}

¹ INRA, LPGP Fish Physiology and Genomics UR1037, Rennes, France

² INRA, UE937 Pisciculture expérimentale des Monts d'Arrée, F- 29450 Sizun, France

³ INRA, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

⁴ AgroParisTech, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants UMR0791, Paris, France

*Corresponding author. Email address: bsadoul@rennes.inra.fr. Phone number: +332.23.48.50.36

1. Introduction

The ability of an organism to respond to an environmental perturbation is of growing scientific concern in animal ecology and in animal production sciences (Korte et al., 2005; Strandberg et al., 2009; Wingfield, 2013). Indeed, in the light of global climate change, the number and the suddenness of extreme meteorological events like drought, flood and storms is increasing. In parallel, despite controlled rearing conditions, environmental perturbations are frequent in animal production and can appear in an unpredictable manner. Depending on animal vulnerability, these environmental perturbations can affect health, welfare, and fitness of the animal (Korte et al., 2007). Therefore, important scientific efforts are going on the characterization of robust animals, defined as not vulnerable to environmental perturbations. However, robustness of biological systems is known to be a complex feature difficult to access and characterize (Carlson and Doyle, 2002; Kitano, 2004). Recent works suggest that approaching robustness need multivariate analysis and that key information about the ability of animals to face acute perturbations can be derived from dynamic of responses to a perturbation (Højsgaard and Friggens, 2010; Sadoul et al., 2014b). The methods used in these cited studies are exclusively based on statistical tools and provide, though interesting, only non-intuitive and descriptive characteristics of the dynamics allowing only between conditions comparisons. Analyses, able to extract from dynamics explicit characteristics on the ability of an animal to face perturbations, would help interpret and communicate on the practical significance of the results.

Physics and biology share many similarities, starting with adjectives and concepts (Lesne, 2008). Terms like plasticity, resistance or elasticity are, indeed, all borrowed from physics and allow describing some robustness features of biological systems facing environmental perturbations. Thus, a robust biological system, on the contrary to the vulnerable one, is for some authors expected to be resistant to acute environmental perturbations and showing good recovery capacities (de Goede et al., 2013; Sauvant and Martin, 2010; Wingfield, 2013). The use of interdisciplinary approaches, e.g. by combining physics and animal science, might help to describe some features of the complex trait of robustness. Indeed, we propose in this study that biological systems facing an acute perturbation can be described in terms of resistance and recovery abilities like the simple physic model of a spring and a damper can be. Therefore, this study aims at (1) investigating the suitability of this model to describe responses of animals to perturbations and (2) showing a concrete example of how this model can be applied in practice in using studies investigating the effect of a perturbation on animals. This second point required data on individuals facing an acute perturbation and monitored before, during and after the perturbation. Therefore, data from a published study investigating the effect of a confinement perturbation on fish were used (Sadoul et al., 2014b).

2. Materials and methods

2.1. General approach

The model proposed in this study is mathematically formulated in terms of a generic model in which a spring and a damper are set in parallel, a model also called the Kelvin-Voigt model (Marques and Creus, 2012). The deformation of the model is given by the x coordinates of the end-point (Figure 35). This model is composed of 2 main parameters describing the properties of the spring and damper (K and C). An environmental perturbation is represented as a force (F_{pert}) that pulls the spring and damper system. We assume that before the challenge, the system is in a non-challenging environment where the force on the model is null. Because animals might perceive differently a challenge that is physically the same, we modulate the force of the perturbation F_{pert} by a coefficient of perception (perc).

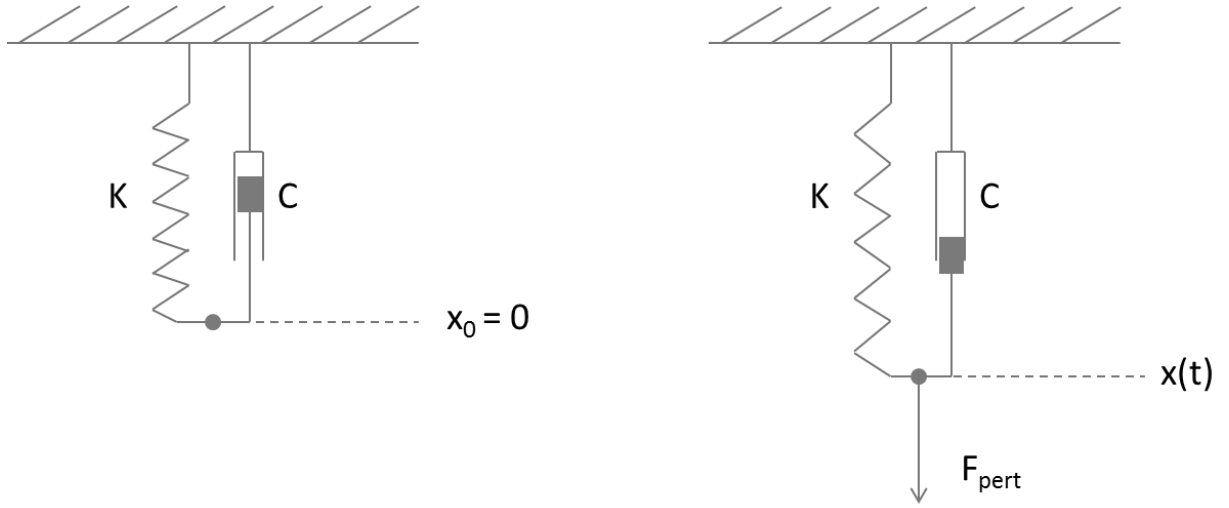


Figure 35. The Kelvin-Voigt model in a non-perturbed environment (1.a) and during a perturbation (1.b).

The model is composed of a spring and a damper in parallel and characterized respectively by the parameters K and C . During a perturbation a force of perturbation (F_{pert}) pulls on the system and the measure of interest $x(t)$ is increased.

2.2. Model formalism

The system follows the differential equation (1.1), determined using the second rule of Newton and where a is the acceleration and v the velocity of the end-point of coordinate x . During the pre-challenge period ($t < \tau_1$), the environment is considered as optimal and not affecting the system. The same assumption is made for the period after the challenge ($t \geq \tau_2$). The term $\text{perc}F_{\text{pert}}$ is therefore considered as negligible during these periods, leading to the equation (1.2). When the perturbation occurs ($t = \tau_1$), the system is affected by a non-negligible environmental perturbation and the equation (1.1) can therefore be transformed to equation (1.3).

$$\text{perc}F_{\text{pert}} * a(t) = \text{perc}F_{\text{pert}} - Kx(t) - Cv(t) \quad (1.1)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} v(t) = -\frac{K}{C} x(t) \end{array} \right. \quad t < \tau_1 \text{ or } t \geq \tau_2 \quad (1.2)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} a(t) = \frac{1}{\text{perc}F_{\text{pert}}} (\text{perc}F_{\text{pert}} - Kx(t) - Cv(t)) \end{array} \right. \quad \tau_1 \leq t < \tau_2 \quad (1.3)$$

For $t \rightarrow +\infty$, we obtain from equation (1.3) the asymptotic elastic solution $x_{inf} = \frac{percF_{pert}}{k}$ (Figure 36). We define the value $T=C/K$ as the decay constant, characterizing the recovery capacity of the system (Figure 36) and x_{max} the value of x at the end of the perturbation.

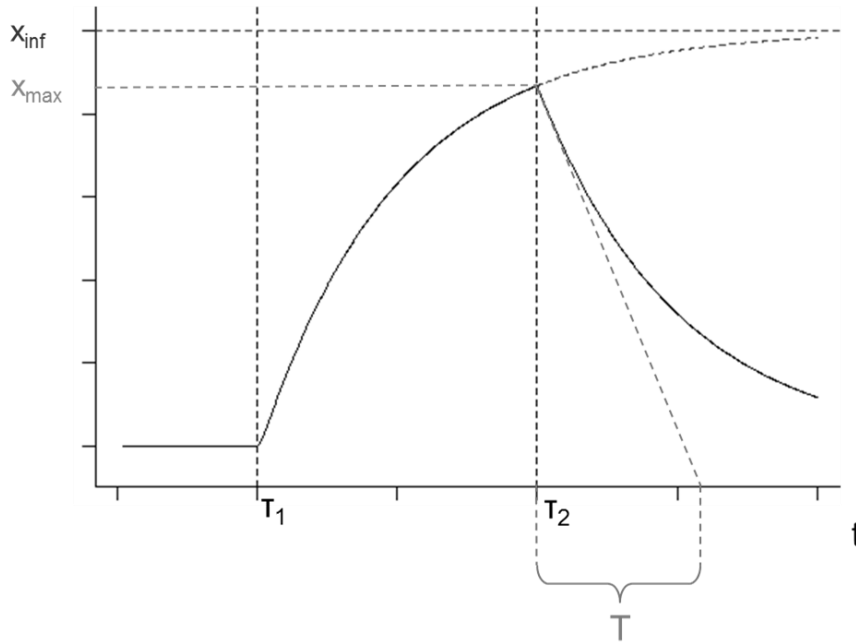


Figure 36. An example of the outcomes of the model and its extrapolated features when continuously and constantly perturbed between τ_1 and τ_2 .

2.3. Sensitivity analysis

In order to describe the flexibility of the model, an analysis of sensitivity was performed by varying one of the parameters K , C or F_{pert} , fixing arbitrarily the two others and running the model. We considered a situation where x is followed during 1000 iterations represented on a time scale of 100, i.e. with a time step of 0.1 time units, and where a constant perturbation F_{pert} occurs between time 20 and 60.

First, values of K were chosen between 0.1 to 1, whereas C and F_{pert} were set to 2 and 1 respectively. Secondly, values of C varied between 0.5 to 20, whereas K and F_{pert} were set to 0.1 and 1 respectively. Finally, values of F_{pert} varied between 1 and 10, whereas K and C were set to 0.1 and 2 respectively. For each analysis of sensitivity, the effect of the changing parameter on x_{max} , x_{inf} and T was given in a continuous graphic.

2.4. Application of the model to a study on the effect of a perturbation in rainbow trout

Data of a study previously published (Sadoul et al. 2014) were used in this analysis. The Materials and Methods section is briefly summarized here, for further details, please refer to Sadoul et al (2014).

Eight aquaria of 1.7L containing each 16 juvenile rainbow trout of similar size were used. Half of the aquaria were containing only fish from the isogenic line A22-B57 (called A), the other half were containing fish from the isogenic line R23-B57. Cortisol release rate, oxygen consumption and group behavior (group dispersion and group activity) were followed at different time points distributed within 10 hours (see Figure 37). A confinement challenge of 4 hours was performed on all aquaria by grouping all the fish of one aquarium in a net. The density was therefore suddenly increased creating a significant stress for the fish.

The experiment was carried out in two replicates one month apart with fish from the same fecundation. Within each replicate, both lines were used. Therefore, for each line a total of 8 aquaria was used. Slight modifications were made between the two replicates to deal with the fish weight difference between the two replicates.

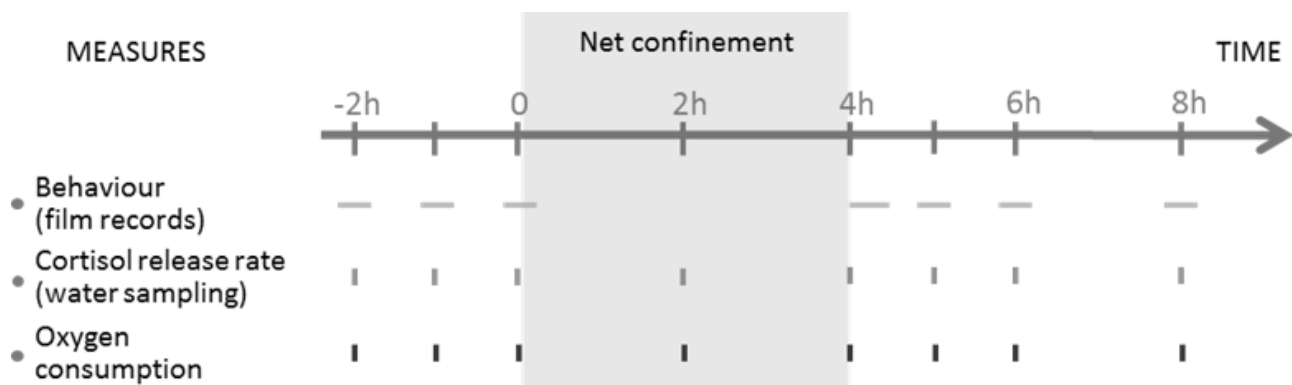


Figure 37. Design of the confinement experiment during time.

Aquaria are followed during time for behavior, cortisol release rate and oxygen consumption. Each horizontal line represents a 10 minutes film record taken by camera placed above the aquaria. Vertical lines correspond to the water sampling points and the oxygen consumption measurements. At time 0, a 4-hour confinement challenge is performed by enclosing all the fish of one aquarium in a net, creating a density of 140kg/m³

2.5. Data preparation

The data preparation steps were based on two hypotheses consisting in (1) considering that the unit of the measures do not have an impact on the parameters of the model (e.g. an increase of 1000 is not more important than an increase of 100 if the initial values are respectively 1000 and 100), and (2) the individuals in the aquarium were, at least at one time point, close to a non-disturbed state (generally just before the challenge or at the end of the recovery period).

Two data preparation steps were conducted to fit to the two hypotheses. In the first step, a particular attention was paid to ensure that the differences in responses to the challenge between individuals, lines and replicates were not deleted by the data preparation. Thus, we conducted a normalization for each measure of each individual using the mean of all aquarium of the corresponding measure, creating fold change of the mean measure. The second step consisted in subtracting, for each individual and measure, the minimum of the normalized individual temporal pattern. All the temporal patterns were therefore shifted so that the minimum value was set to 0.

The 10 hours of the experiment were transformed onto a 0 to 100 scale, with the challenge occurring between 20 and 60. This arbitrary scale from 0 to 100 will help comparison with future analyses initially on different time scales.

2.6. Model assumptions and model fitting

The perturbation force F_{pert} was assumed to be positive, creating an extension of the spring. During the perturbation, $x(t)$ will therefore increase and the variations in the different measures need to be positive. In this study we assume that all aquarium are subjected to the same perturbation (F_{pert}), arbitrarily set to 0.1. For simplicity, the differences between aquaria in perception of the perturbation (perc) are assumed to be negligible here, and therefore, the perception is set to 1 for all individuals. In this study, fitting the model consists therefore in optimizing only the parameters K and C of the model. The system was described to be in its non-disturbed state when $x=1$. The optimization procedure was performed using the `optim` function on differential equations (1.2) and (1.3) solved using the `ode` function in the free software R 2.14.0 (<http://cran.r-project.org/>).

The optimization procedure was first run on the mean temporal pattern of each measure, to assess the ability of the model to fit different experimental data.

The model was then optimized on each individual temporal pattern for each measure, providing a $K_{i,m}$, and a $C_{i,m}$ for individual i and measure m .

2.7. Model outputs analysis

The model fitting performance was calculated for each aquarium and each measure using the modeling efficiency statistic (MEF) as described in the review of Tedeschi (Tedeschi, 2006) and calculated using the following formula, with Y_i the observed value i , Y_{mod_i} the corresponding model value and \bar{Y} the observed mean:

$$MEF = 1 - \frac{\sum_i (Y_i - Y_{mod_i})^2}{\sum_i (Y_i - \bar{Y})^2}$$

A MEF value of one would indicate a perfect fit. On the contrary, a negative value of MEF suggests that the model values are worse than the observed mean.

The few results where model was not able to correctly fit the individual temporal pattern (when C or K is lying beyond 1.5 times the interquartile range) were withdrawn from the analysis. This corresponded to 1 aquarium (line A) for the cortisol release rate, 3 (2 line A, 1 line R) for the oxygen consumption, 0 for the group activity and 3 (1 line A, 2 line R) for the dispersion.

For statistical analyses, K_s and C_s were log-transformed to increase normality. Significant differences in K_s and C_s between the two lines were assessed using linear mixed model with line, replicate and the interaction as fixed effects and aquarium as a random effect. Non-significant fixed effects were withdrawn from the model and the model was re-run. The mean estimation of K and C for each line and the p -value for the line effect were extracted from the final model. Correlations between parameters were calculated using simple Pearson's correlation coefficients.

All statistical analyses were run using the free software R 2.14.0 (<http://cran.r-project.org/>).

3. Results

3.1. Model flexibility

The variations of C and K in the model result in a strong diversity of dynamics (Figure 38 and Figure 39). As expected, the parameter K has a strong effect on the amplitude of the response (Figure 38). The relationship between the maximum of the amplitude and K is inversely exponential, with low values of K strongly increasing the amplitude of the response. Similarly, the time of recovery T is inversely exponential to parameter K, with a strong decrease when the resistance increases. The parameter C has a strong impact on the shape of the response since it influences the speed of the deformation (Figure 39). This parameter has no impact on the asymptotic x (x_{inf}), however it impacts the x_{max} value if the time of perturbation is not long enough to enable the system to reach x_{inf} . When the time of perturbation is low, the value x_{max} and C are inversely proportional. The relationship between the time of recovery and C is proportional. The variable F_{pert} has a linear positive impact on the amplitude of response x_{max} and x_{inf} (Figure 40). It has however no impact on the recovery.

3.2. Adjustment to mean responses in a real study

After data preparation, the mean temporal pattern for each measure was calculated and presented in Figure 41. Globally, fish subjected to a confinement challenge display an increase of cortisol release rate, oxygen consumption and group behavior (activity or dispersion). The model was adjusted to the four mean responses to evaluate its ability to fit different physiological and behavioral responses to a perturbation. Adjustments were, despite the amplitude differences, very satisfactory (continuous lines in Figure 41) with important MEFs (0.98, 0.88, 0.90, 0.67 for the cortisol release rate, the group activity, the oxygen consumption and the group dispersion respectively). The highest point of the model is reached at the end of the confinement period. The 4 measures show very divergent amplitude of response to the challenge, translated by contrasted K values. The measure cortisol release rate was on average multiplied by 4 ($x_{max}=4.4$). On the opposite, group dispersion was only multiplied by around 1.3 ($x_{max}=1.31$). These differences in amplitude result in a resistance 11 times (K_{disp}/K_{cort}) stronger for group dispersion than for cortisol. Before the challenge (time <20), the model shows a temporal pattern similar to the recovery period after the challenge (time >60).

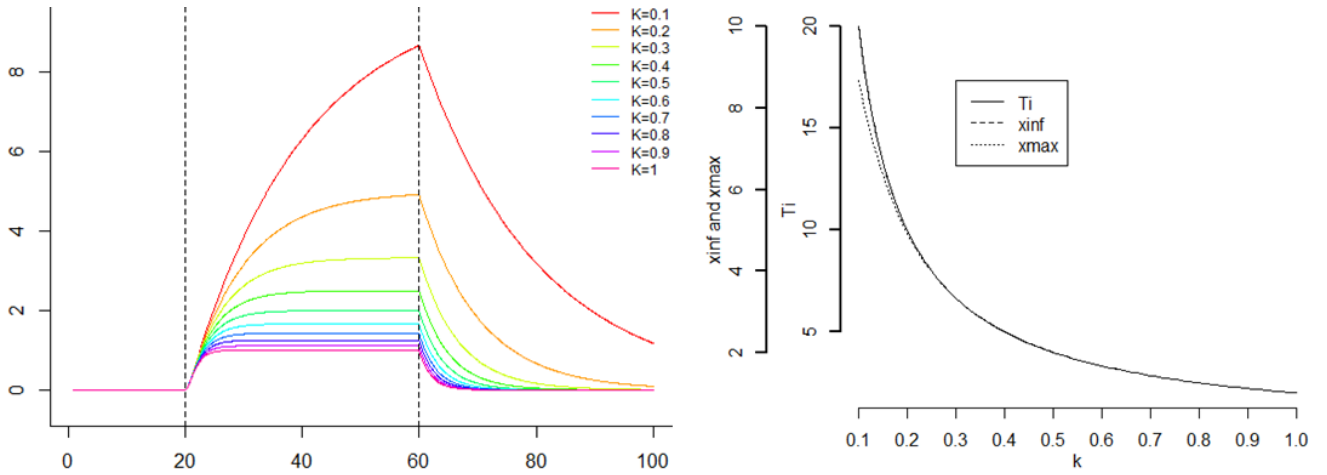


Figure 38. Analysis sensitivity of the model where the parameter K varies and a continuous perturbation occurs between 20 and 60.

For this analysis, perc was set to 1, F_{pert} to 1 and C to 2. K varies between 0.1 and 1.

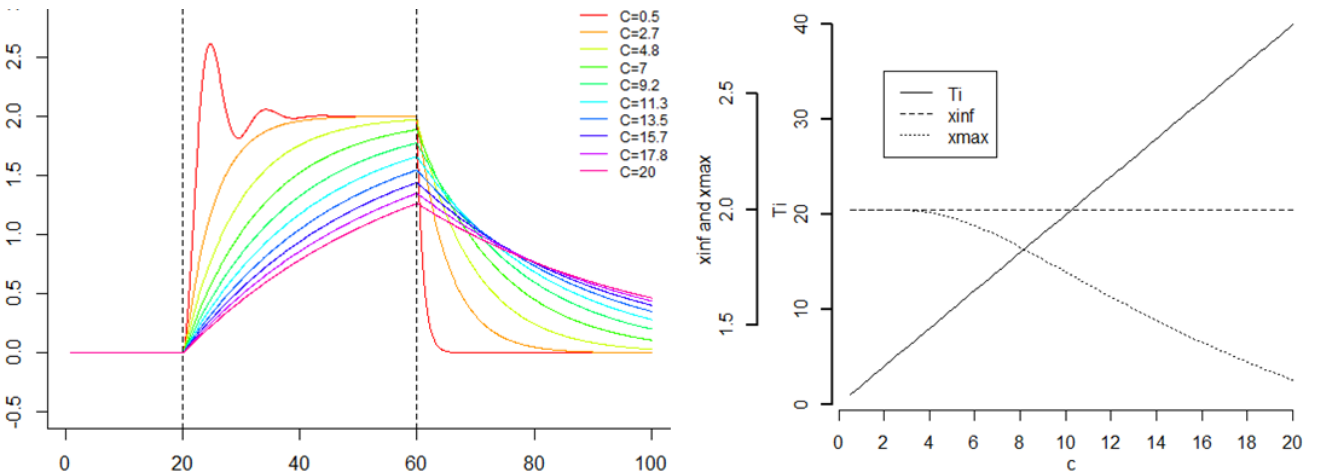


Figure 39. Analysis sensitivity of the model where the parameter C varies and a continuous perturbation occurs between 20 and 60.

For this analysis, perc was set to 1, K to 0.1 and F_{pert} to 1. C varies between 0.5 and 20.

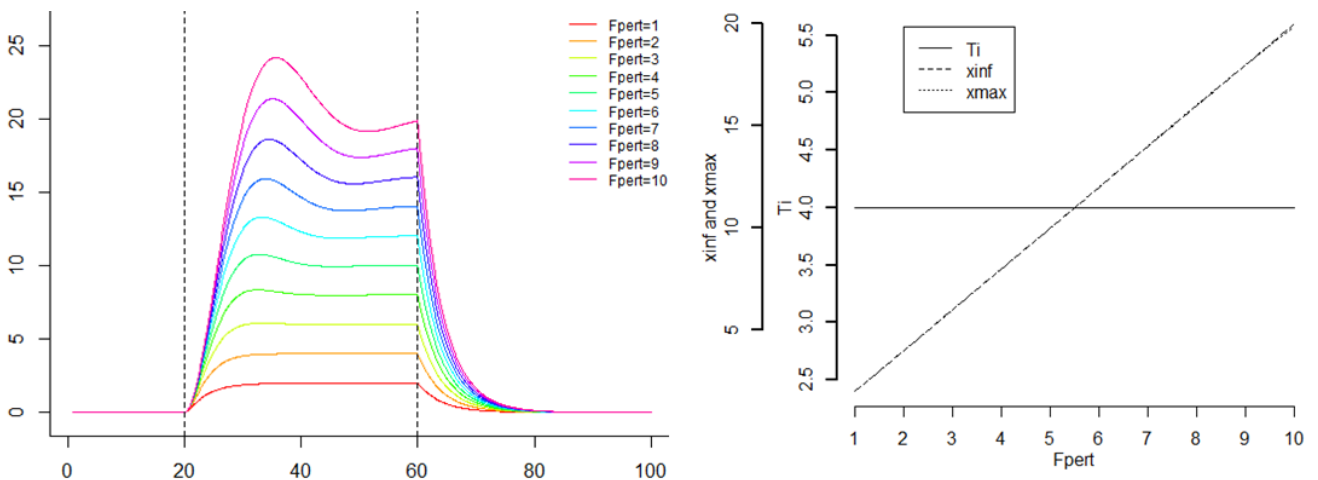


Figure 40. Analysis sensitivity of the model where the parameter F_{pert} varies and a continuous perturbation occurs between 20 and 60.

For this analysis, perc was set to 1, K to 0.1 and C to 2. F_{pert} varies between 0.1 and 1.

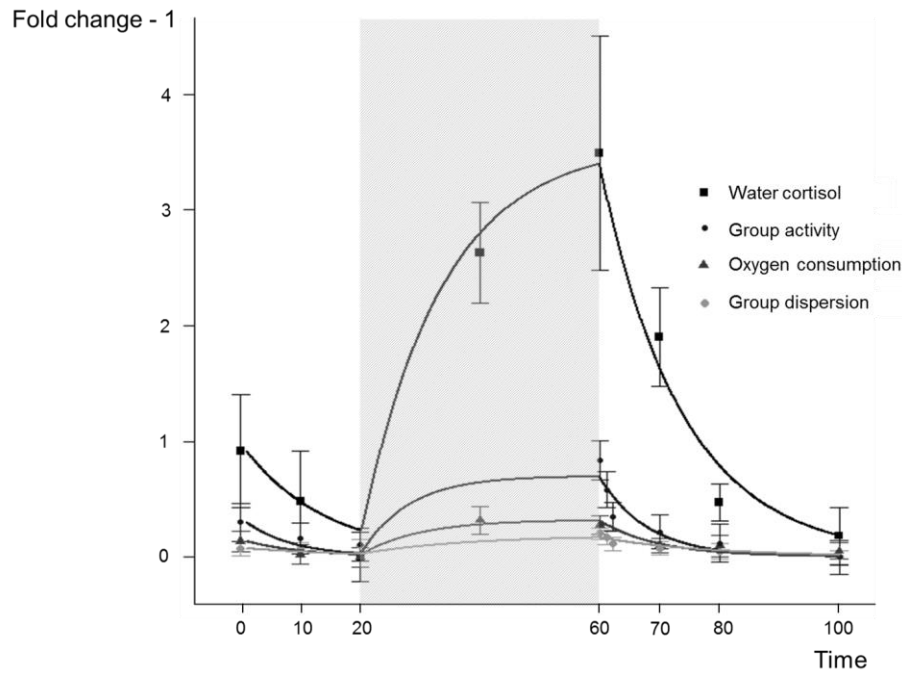


Figure 41. Fitting the model to cortisol release rate, oxygen consumption, group activity and group dispersion during in rainbow trouts facing and recovering from a confinement challenge (grey rectangle).

Data (observed values \pm SE) are expressed as fold change. Resistance (K) and resilience (C) parameters of the model were fitted on the mean of the cortisol release rate ($K=0,028$, $C=0,384$), group activity ($K=0,143$, $C=1,137$), oxygen consumption ($K=0,314$, $C=3,052$) and the group dispersion ($K=0,542$, $C=9,809$) measures.

3.3. Adjustment to individual responses

The induced stress responses were adjusted using the model for each variable and each individual aquarium, producing one K and C for each. The results were summarized in Table 7 presenting the average K and C for each line and each measure, and the significance of the line effect on the parameters. The cortisol release data show a significant difference in K, with line R being two times more resistant than line A. Similarly, line R shows an almost significant ($p\text{-value}=0.051$) more important C value than line A. In consequence, the two lines show very similar recovery rates (T) for the cortisol release rate. For the oxygen consumption, line R tends ($p\text{-value}=0.08$) to show a stronger resistance to the perturbation than line A. This is translated by the significant more important x_{inf} value for line A. In contrast, line A showed a stronger resistance in the group dispersion measure ($p\text{-value}<0.1$) with a x_{inf} significantly lower. For group activity, the two lines do not differ on a resistance basis but a significant difference in the time of recovery (T) due to the C parameter.

Table 7. Adjusted (K and C) and calculated (T and xinf) parameters from the model, for two isogenic lines subjected to a confinement challenge.

The significance of the line effect is given by the p-value extracted from a linear mixed model where K or C is explained by line and, if significant, replicate and interaction, and aquarium as a random effect.

	Cortisol release rate				Oxygen consumption				Group dispersion				Group activity			
	K	C	T	X _{inf}	K	C	T	X _{inf}	K	C	T	X _{inf}	K	C	T	X _{inf}
Line A	0,018	0,302	17,501	6,628	0,080	1,074	17,825	1,312	0,453	3,871	18,814	0,26	0,120	0,740	9,275	1,022
Line R	0,039	0,537	14,799	2,808	0,179	1,449	11,889	0,724	0,245	5,791	41,657	0,45	0,126	2,428	25,539	0,920
p-value	0,003	0,051	0,260	<0,0001	0,089	0,526	0,270	0,016	0,058	0,609	0,174	0,028	0,8398	0,075	0,027	0,733

Table 8. Pearson’s correlation coefficients table between adjusted parameters.

Significant correlation (***) or tendencies (*) or tendencies (P<0.1) in bold.

	Cortisol release rate		Group dispersion		Oxygen consumption		Group activity	
	K	C	K	C	K	C	K	C
Cortisol release rate	K 1	C 0,94*** 1,00	K -0,17 -0,16	C -0,42 -0,42	K 0,56* 0,51°	C 0,36 0,43°	K -0,30 -0,39	C -0,31 -0,47°
Group dispersion	K K	C C	K 0,39 1,00	C -0,42 1,00	K 0,43 0,13 1,00	C 0,07 -0,22 0,61*	K 0,49° 0,11	C 0,52* 0,11
Oxygen consumption	K C	C C	K 1,00	C 1,00	K 1,00	C 0,61* 1,00	K -0,18 1,00	C -0,15 0,54*
Group activity	K C	C C	K 1,00	C 1,00	K 1,00	C 0,54* 1,00	K 1,00	C 0,54* 1,00

3.4. *Between parameter correlations*

The correlations between the different K and C for each measure are shown in Table 8. Within measure K and C were, for all measures (except for group dispersion, p -value=0.13), positively correlated. In addition, Ks of the two physiological parameters (water cortisol and oxygen consumption) were positively correlated. A similar trend was found between (p -value=0.056) the Ks of the two behavioral parameters. Similar results were found for the Cs. The parameter C of the cortisol release rate tended to be negatively correlated with the behavioral Cs.

4. Discussion

The purpose of this study was to see if a simple physics model of elasticity could be useful to describe an important diversity of temporal dynamics during and after an environmental perturbation of a system. Fitting the model to data on multiple measures of stress in fish subjected to an acute perturbation illustrate the capacity of the model to characterize the resistance and the ability to recover from a perturbation for each single system and measure.

4.1. *The Model parameters*

By considering the system using a physic model, two important features of the system, resistance and recovery capacity, can be explicitly described and pictured. The environmental perturbation, by pulling on the system, creates a distortion and changes the values of the system measure. The temporal patterns of the four responses were found to follow the dynamic equation of a spring and a damper. The parameter describing the resistance of the spring (K) provides an explicit measure of the capacity of the biological system to face the perturbation. The Ks can be compared between responses and individuals to describe which one was the most affected (the less resistant) by the perturbation. Similarly, the parameter C of the equation, corresponding to the friction of the damper, can be set in parallel with the recovery capacities of the biological system. With a similar resistance, a low C translates a good capacity to return to initial state.

The resistance is described in production science and in ecology as an important faculty of the animal to minimize variations in target features important for productivity or reproduction when facing acute environmental perturbations (Strandberg et al., 2009; Wingfield, 2013). Similarly, an animal taking short period of time to recover from a disturbance is of great interest since it can return quickly to its target features (de Goede et al., 2013; Knap, 2005;

Napel et al., 2006). In our confinement experiment, the individuals showing strong resistance and good recovery capacities are therefore individuals that avoid triggering physiological and behavioral responses facing a perturbation which is not life-threatening, since it does not affect water quality or fish integrity. In this experiment, we define therefore, individuals having strong resistance and good recovery capacities as robust animals (Wingfield, 2013).

4.2. Physiological and behavioral dynamics analyzed using the model

All measures conducted on fish subjected to a confinement showed an increase after the perturbation compared to before. These variations were detectable and quantifiable using the present model. Being able to describe temporal patterns is often an important challenge in experimental studies (Fertuck et al., 2003; Højsgaard and Friggens, 2010; Schuring et al., 2012). The model respectfully adjusted our individual data, and seems therefore to be a relevant method to describe responses of perturbed systems. On the contrary to a previous analysis of these data (Sadoul et al. 2014), where the different periods of the dynamics (increase and decrease) were analyzed sequentially, the use of the model enables to analyze simultaneously all points of the temporal patterns and reduce therefore the effect of unexplained variances of isolated time points. Furthermore, the model provides comparable data in standardized common units facilitating between-challenge analogies, between-responses correlations or between-subject comparisons.

The model describes an increase and an early reach of values close to the maximum response in group behavior during the challenge. However, though we do not have measures during the perturbation, group dispersion is by consequence very small during a confinement challenge and activity is intuitively rather small compared to behavior in the tank. The model does therefore not provide a good estimation of the group behavior during the perturbation. However, it gives an estimation of the behavioral state during the challenge, with values indicating how fish would behave if they were released at a given time. The performance of the model during the challenge could therefore be evaluated by replicating the perturbation with varying duration, e.g. confine the fish during 1 hour and verify whether or not the fish are starting their recovery with the behavior value indicated at time $t=1h$ in the 4 hours confinement study.

For oxygen consumption and cortisol release, line R shows stronger resistance to the challenge compared to line A. The time to recover from the challenge is similar between the two lines for these physiological measures. These results confirm the suppositions made in a

previous analysis of the data (Sadoul et al. 2014). However, the present analysis showed divergent group behavior responses between the two lines that were not detected in the previous analysis. Indeed, line A shows stronger resistance to the challenge when considering the group dispersion behavior, and better recovery ability when considering the group activity behavior. These results indicate therefore the existence of divergent coping strategies between the two lines, with one line being more sensitive in its physiological mechanisms and on line being more affected for its behavioral parameters.

4.3. Model implications and potentials

The presented model was constructed to be sufficiently generic to be able to describe very different systems and responses. We have shown in this study its ability to fit with physiological and behavioral stress related measures. By using a same model, we can extract from diverse temporal patterns with various scale units, comparable features of resistance and recovery capacities. Inversely, the model can help characterizing different perturbations of various types, e.g. social stress versus physical stress, and comparing them on a same common scale. This model would, for example, have been of particular use for estimating the difference of perturbation intensity (F_{pert} in our model) in previous welfare studies evaluating stress dynamics (sensitivity and recovery) depending on different veterinary methods (see for review (Mellor et al., 2000)).

We can also imagine being able to use the model for extracting and analyzing the perturbation dynamics due to micro-environmental variations in natural or rearing conditions. Indeed, new technologies based on video analysis or biosensors are rapidly developing and are increasingly being deployed to monitor domestic or wild animals. These can produce important dynamic data on behavioral and physiological stress mechanisms, needing tools to analyze and interpret (Ellis et al., 2004a; Sadoul et al., 2014b; Takase et al., 2014; Wilson and Gifford, 2005). Recent work described a method to identify periods of deviance from the basic life trajectory of cows monitored for their milk yield (Friggens et al., 2011). Combining this method and our model could potentially enable identifying and characterizing, from dynamic data of monitored animals, their resistance and recovery capacity facing micro-environmental perturbations in the nature or in the rearing systems.

Conclusions

Overall, the spring-damper model appears to be a good solution for modeling responses to a simple acute perturbation. It provides a new way to explicitly describe, analyze and compare responses of individuals facing an acute perturbation. Although the model was fitted to physiological and behavioral responses in fish, we are convinced that it can adjust many types of biological system responses. Future work is envisaged to complexify the model in order to take into account more diversified perturbations, e.g. chronic, combined or repeated perturbations. Indeed, by adding some specific features to the model, the updated model shall be tested to approach notions of stress accumulations, sequential stressors, simultaneous stressor, habituation or compensation.

References

- Carlson, J. M., et John Doyle. 2002. « Complexity and Robustness ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 Suppl 1 (février): 2538-45. doi:10.1073/pnas.012582499.
- De Goede, D. M., B. Gremmen, et M. Blom-Zandstra. 2013. « Robust agriculture: Balancing between vulnerability and stability ». NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences 64–65 (septembre): 1-7. doi:10.1016/j.njas.2012.03.001.
- Ellis, T., J. D. James, C. Stewart, et A. P. Scott. 2004. « A Non-Invasive Stress Assay Based upon Measurement of Free Cortisol Released into the Water by Rainbow Trout ». Journal of Fish Biology 65 (5): 1233-52. doi:10.1111/j.0022-1112.2004.00499.x.
- Fertuck, K. C., J. E. Eckel, C. Gennings, et T. R. Zacharewski. 2003. « Identification of Temporal Patterns of Gene Expression in the Uteri of Immature, Ovariectomized Mice Following Exposure to Ethynylestradiol ». Physiological Genomics 15 (2): 127-41. doi:10.1152/physiolgenomics.00058.2003.
- Friggens, N. C., M. C. Codrea, et S. Højsgaard. 2011. « Extracting Biologically Meaningful Features from Time-Series Measurements of Individual Animals: Towards Quantitative Description of Animal Status ». In Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, édité par D. Sauvant, J. Van Milgen, P. Faverdin, et N. Friggens, 40-48. Wageningen Academic Publishers. http://link.springer.com/chapter/10.3920/978-90-8686-712-7_4.
- Højsgaard, S., et N. C. Friggens. 2010. « Quantifying degree of mastitis from common trends in a panel of indicators for mastitis in dairy cows ». Journal of Dairy Science 93 (2): 582-92. doi:10.3168/jds.2009-2445.

- Kitano, Hiroaki. 2004. « Biological Robustness ». *Nature Reviews Genetics* 5 (11): 826-37. doi:10.1038/nrg1471.
- Knap, P.W. 2005. « Breeding robust pigs ». *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45 (8): 763-73.
- Korte, S Mechiel, Jaap M Koolhaas, John C Wingfield, et Bruce S McEwen. 2005. « The Darwinian Concept of Stress: Benefits of Allostasis and Costs of Allostatic Load and the Trade-Offs in Health and Disease ». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29 (1): 3-38. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.08.009.
- Korte, S. Mechiel, Berend Olivier, et Jaap M. Koolhaas. 2007. « A New Animal Welfare Concept Based on Allostasis ». *Physiology & Behavior* 92 (3): 422-28. doi:10.1016/j.physbeh.2006.10.018.
- Lesne, Annick. 2008. « Robustness: Confronting Lessons from Physics and Biology ». *Biological Reviews* 83 (4): 509-32. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00052.x.
- Marques, Severino P. C., et Guillermo J. Creus. 2012. *Computational Viscoelasticity*. Springer Science & Business Media.
- Mellor, D. J., C. J. Cook, et K. J. Stafford. 2000. « Quantifying some responses to pain as a stressor ». *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Welfare*, 171-98.
- Moberg, Gary P., et Joy A. Mench. 2000. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI.
- Napel, J. ten, F. Bianchi, et Monique Bestman. 2006. « Utilising intrinsic robustness in agricultural production systems: Inventions for a sustainable development of agriculture ». In . *TransForum Agro & Groen*. <http://core.kmi.open.ac.uk/display/10929438>.
- Sadoul, Bastien, Isabelle Leguen, Violaine Colson, N C Friggens, et P. Prunet. 2014. « A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a confinement stress ».
- Sauvant, D., et O. Martin. 2010. « Robustesse, rusticité, flexibilité, plasticité... les nouveaux critères de qualité des animaux et des systèmes d'élevage: définition systémique et biologique des différents concepts ». *Productions animales* 23 (1): 5-9.
- Schreck, C. B. 2000. « Accumulation and long-term effects of stress in fish ». *The biology of animal stress*, 147-58.
- Schuring, Ewoud, Frits Quadt, Eva M. R. Kovacs, Jean-François Meullenet, Sheila Wiseman, et David J. Mela. 2012. « A quantitative method for estimating and comparing the duration of human satiety responses: Statistical modeling and application to liquid meal replacers ». *Appetite*, The 36th annual meeting of the British Feeding and Drinking

- Group, March 29th and 30th 2012, Brighton, UK, 59 (2): 601-9. doi:10.1016/j.appet.2012.07.003.
- Strandberg, E., M. Klopčič, R. Reents, J. Philipsson, et A. Kuipers. 2009. « The role of environmental sensitivity and plasticity in breeding for robustness: lessons from evolutionary genetics ». *Breeding for Robustness in Cattle*. M. Klopčič, R. Reents, J. Philipsson, and A. Kuipers, ed. EAAP Scientific Series, no 126: 17-33.
- Takase, Mai, Masataka Murata, Kyoko Hibi, Ren Huifeng, et Hideaki Endo. 2014. « Development of Mediator-Type Biosensor to Wirelessly Monitor Whole Cholesterol Concentration in Fish ». *Fish Physiology and Biochemistry* 40 (2): 385-94. doi:10.1007/s10695-013-9851-1.
- Tedeschi, Luis Orlindo. 2006. « Assessment of the adequacy of mathematical models ». *Agricultural Systems* 89 (2-3): 225-47. doi:10.1016/j.agsy.2005.11.004.
- Wilson, George S., et Raeann Gifford. 2005. « Biosensors for real-time in vivo measurements ». *Biosensors and Bioelectronics, 20th Anniversary of Biosensors and Bioelectronics* 20th Anniversary of Biosensors and Bioelectronics, 20 (12): 2388-2403. doi:10.1016/j.bios.2004.12.003.
- Wingfield, John C. 2013. « The comparative biology of environmental stress: behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments ». *Animal Behaviour* 85 (5): 1127-33. doi:10.1016/j.anbehav.2013.02.018.

DISCUSSION

Nous avons choisi d'aborder la robustesse à travers les réponses adaptatives de deux lignées isogéniques de truite arc-en-ciel. En décrivant et en intégrant leurs réponses physiologiques et comportementales face à deux challenges environnementaux différents, nous avons déterminé leur degré de perturbation et apporté des informations concernant l'importance de l'interaction génotype \times environnement sur les réponses.

Les principaux résultats des études présentées dans les chapitres 2 et 3 sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Résumé des principaux résultats des expériences de confinement et d'hypercapnie sur les lignées isogéniques A et R de truite arc-en-ciel.

Type de challenge	Réponses physiologiques	Réponses comportementales	Variabilité des réponses physiologiques	Variabilité des réponses comportementales	Lien agressivité pré-challenge sur la réponse cortisol
Confinement	A>>>R	A=R	A>>>R	A=R	oui
Hypercapnie	R>A	A=R	R>>>A	A=R	non

Durant cette thèse, nous avons dû faire face à plusieurs challenges:

- Obtenir des données répétées
- Décrire les cinétiques de réponse
- Intégrer les données de disciplines différentes et analyser les composantes de la variabilité
- S'approprier un modèle capable de décrire et quantifier les composantes de la capacité d'adaptation

Les problèmes techniques de mesures répétées ont été rapidement surmontés grâce à la création ou à l'adaptation des méthodes d'analyse. Concernant les trois autres points, des solutions ont été proposées qui ont soulevé des questionnements et ont montré des limites qui méritent d'être discutées ici.

1 Aborder la robustesse en décrivant les mécanismes sous-jacents

1.1 La théorie de l'allocation de ressources et la notion de trade-off

Que ce soit en écologie ou en agronomie, il est généralement admis que l'animal dispose d'une quantité finie d'énergie qu'il doit répartir entre ses fonctions (Leroi, 2001; Schluter et al., 1991). La théorie de l'allocation de ressources décrit cette nécessité de partition de ressources entre les différents traits de l'animal (Beilharz et al., 1993). Généralement, il est considéré que ceci est également le cas lors d'une perturbation environnementale (McNamara and Buchanan, 2005). En effet, l'animal peut dépenser de l'énergie pour faire face à la perturbation (fuir, s'adapter, combattre, etc.) ou au contraire conserver son énergie pour ses fonctions d'entretien (osmorégulation, croissance, stockage d'énergie, formation de gonades, etc.). Les risques de ne pas survivre à la perturbation sont donc soit liés directement à la perturbation par une incapacité à faire face (capture par le prédateur, asphyxie, hypothermie, etc.), soit à un manque d'énergie allouée aux fonctions d'entretien (faible immunocompétence, hyperhydratation, etc.). L'individu robuste doit alors être capable de mettre en place le meilleur compromis (ou trade-off) entre les deux possibilités d'allocation d'énergie en situation de perturbation environnementale.

Nous avons fait le choix d'étudier l'effet de perturbations aiguës dont la force et la durée ont été fixées afin de ne pas entraîner la mort des poissons. Tous les individus ont ainsi fait face à la perturbation en montrant des profils de réponses très différents. Nous pouvons donc faire une première hypothèse, développée ici, que les réactions fortes montrées par certains bacs sont des réactions superflues. Les poissons de ces bacs ont alloué trop d'énergie pour faire face, et ne vont donc pas dans le sens d'une bonne robustesse. Dans ces conditions, nous estimons que les individus montrant le moins de modifications des mécanismes adaptatifs sont les moins sensibles à la perturbation. Selon cette hypothèse, la résistance de l'état du système traduit donc directement la robustesse de l'animal. Ce parallèle va dans le sens de Wingfield (Wingfield, 2013), définissant les individus qui seront les mieux adaptés pour faire face à un environnement continuellement imprévisible comme les individus répondant le moins fortement aux perturbations et revenant rapidement à leur état initial.

La comparaison entre les deux lignées isogéniques a montré un inversement de la résistance relative entre les deux challenges. La lignée R s'est, en effet, montrée plus

résistante lors du challenge de confinement que la lignée A. Mais l'inverse a été observé lors du challenge d'hypercapnie. Il semblerait donc que les poissons étudiés présentent des capacités à faire face qui sont variables selon le challenge. La robustesse des lignées isogéniques serait donc liée au type de challenge. Les lignées seraient spécialisées pour faire face à certains challenges plus que d'autres. La sélection génétique des deux lignées a peut-être favorisé la capacité à faire face à un challenge au dépend de la capacité à faire face à un autre challenge.

1.2 Risques de la résistance à tout prix

1.2.1 Réagir pour mieux faire face

Jusque-là nous avons fait l'hypothèse que des variations fortes de mécanismes adaptatifs ne sont pas bénéfiques pour l'animal dans nos conditions de challenge. Nous avons en effet, supposé que mettre en place des mécanismes adaptatifs pour faire face à un challenge de courte durée et ne mettant pas en cause la survie de l'animal était superflu et coûteux en énergie. Il est cependant important de s'interroger sur l'existence à long terme, d'un effet positif de la réponse à ce type de challenge. La réaction à un challenge permet peut-être de mieux faire face à un challenge ultérieur qu'il soit de même nature ou totalement différent. Dans ce sens, de nombreuses études ont montré les effets positifs de challenges environnementaux. Ainsi, une expérience de challenge précoce d'alimentation végétale chez la truite a montré une amélioration de l'efficacité alimentaire sous un même challenge 7 mois plus tard (Geurden et al., 2013). De la même façon, une période de perturbations successives (immobilisation, capture, mouvements) améliorerait la flexibilité comportementale, composante des performances cognitives de l'animal, via l'activation du système catécholaminergique chez la caille (Calandreau et al., 2011). Il est également maintenant connu que certains challenges aigus entraînant la mise en place de mécanismes adaptatifs favorisent le système immunitaire chez les poissons (Tort, 2011). Il semble donc globalement restrictif d'interpréter une modification comportementale ou physiologique comme une réaction négative face à une perturbation. Dans des situations de stress bénéfiques (eustress), les individus qui résistent ne bénéficient peut-être pas des aspects positifs de la réponse.

1.2.2 *Les problèmes éthiques de la résistance à tout prix en agronomie*

La doctrine utilitariste développée par Bentham (Bentham, 1789) recommande de maximiser les intérêts et le bonheur du plus grand nombre, en incluant les êtres sensibles capables de souffrir. Or, depuis 1976, la loi confère à l'animal un statut juridique le reconnaissant comme un être sensible. Le principal challenge en agronomie a donc été de mettre en place des stratégies d'élevage permettant d'améliorer la production tout en préservant la santé, le bien-être et de supprimer la souffrance animale. Une stratégie consiste à sélectionner des animaux dont la résistance est forte, c'est-à-dire des animaux faiblement affectés (un faible degré de perturbation) par les modifications de leur environnement. Sans changer les conditions d'élevage, le bien-être des animaux est ainsi amélioré et le rendement est augmenté grâce à une allocation d'énergie dédiée à la production.

Le paroxysme de cette approche peut cependant conduire à des solutions souvent considérées comme éthiquement non valables (Clark et al., 2006; Sandoe et al., 1999), dont l'exemple le plus connu est celui de la poule génétiquement aveugle. Certains auteurs ont montré les améliorations du bien-être et de la productivité de ces animaux résistants aux perturbations environnementales grâce à une diminution des systèmes de perception (Ali and Cheng, 1985). En décrivant la robustesse comme la résistance des réponses adaptatives face aux perturbations environnementales, la stratégie retenue risque de se tourner vers la sélection d'individus percevant et réagissant le moins possible.

1.3 L'idéal : réagir avec modération ?

Nous avons vu que chercher à décrire la robustesse à travers la résistance des mécanismes adaptatifs sous-jacents était trop réductif d'un point de vue physiologique et éthique. Cependant, nous avons également vu qu'une trop faible résistance pouvait montrer des limites de bien-être et de survie. Il semble donc important que les mécanismes adaptatifs soient déclenchés sous certaines conditions.

Pour Koolhaas et al (2011), une perturbation environnementale nuisible (stressor) se caractérise qualitativement comme non-contrôlable et non-prévisible, mais également comme étant suffisamment forte pour menacer la survie de l'animal. Les deux perturbations étudiées pendant cette thèse ont été réalisées afin qu'elles soient non-contrôlables et non-prévisibles. Cependant, la force des perturbations est discutable. Est-ce que le confinement et l'hypercapnie effectués durant ce projet ont un même caractère nuisible pour l'animal ?

Intuitivement, le confinement semble être un stress moins menaçant pour l'animal que l'hypercapnie qui, à plus forte dose peut entraîner rapidement la mort de l'animal. La mise en place de mécanismes adaptatifs tels qu'une diminution de l'activité, une augmentation de l'hématocrite, et du rythme cardiaque (Perry and Abdallah, 2012; Ross et al., 2001) permet de faire face à la perturbation d'hypercapnie si celle-ci dure dans le temps ou s'amplifie. Dans le cas d'une perturbation menaçante, nous pouvons nous poser la question de l'intérêt de la résistance pour la robustesse de l'animal. Est-ce que des individus qui répondent fortement à la perturbation menaçante ne sont pas finalement ceux qui maximisent leur chance de survie ? Une étude réalisée chez le rat a, par exemple, montré que la tolérance à un challenge de température était positivement corrélée à l'activité de l'axe corticotrope (Michel et al., 2007). Sous cette hypothèse, nous pouvons supposer que l'individu le plus robuste est l'animal qui répond faiblement aux perturbations ne menaçant pas sa survie mais fortement aux perturbations plus menaçantes. Se pose cependant la question de la menace de la perturbation, à partir de quand une perturbation est dite menaçante, et à partir de quand estimer qu'un individu doit répondre ? Une perturbation menaçante peut être caractérisée par une intensité (ou force) importante et/ou par une durée longue. Ainsi, l'individu robuste doit être capable de montrer des réponses adaptatives appropriées à la force et la durée de la perturbation (Figure 42). La lignée R qui montre une faible réactivité des mécanismes adaptatifs pour le confinement mais une forte réactivité pour l'hypercapnie serait alors considérée comme plus robuste car capable de répondre lorsque nécessaire.

2 Les lignées isogéniques, variabilités, apports et interrogations

Au sein de chaque lignée isogénique, l'ensemble des individus présente en théorie le même génome. Toutes les truites d'une même lignée isogénique ont également été élevées dans un même bassin d'élevage jusqu'au début de l'acclimatation aux bacs expérimentaux. Les bacs expérimentaux sont tous identiques et tous les poissons y reçoivent les mêmes soins. Pourtant, de fortes variabilités dans les degrés de perturbation face à une perturbation identique sont observées au sein de chaque lignée isogénique.

Comment expliquer ces différences ? Quelles en sont les conséquences ?

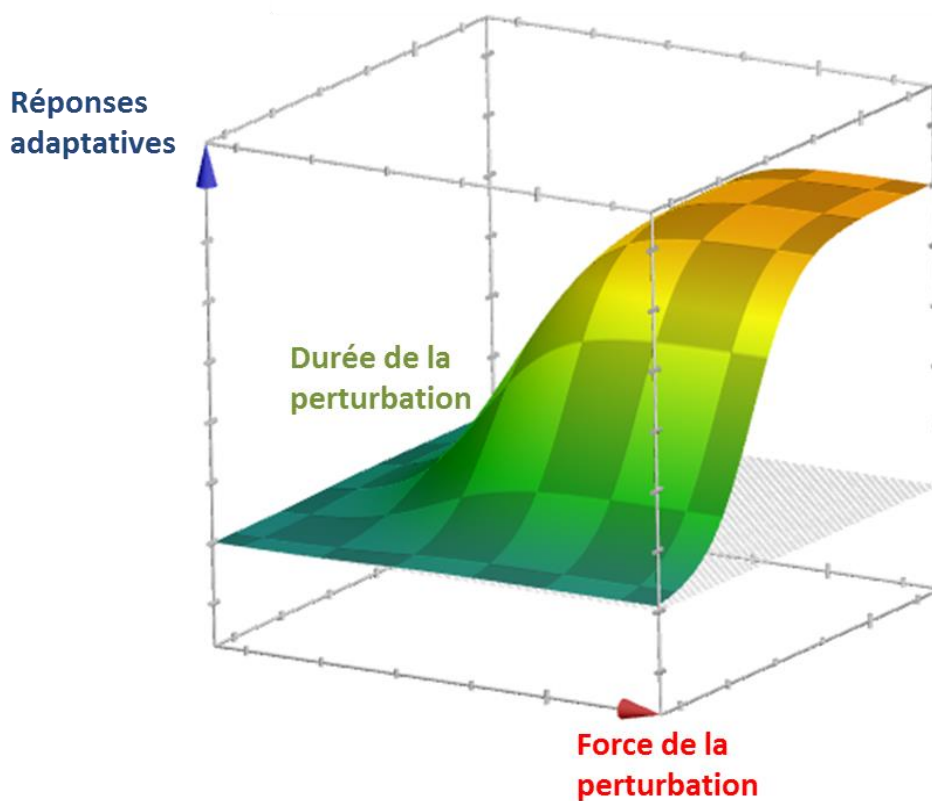


Figure 42. Les réponses adaptatives d'un individu robuste doivent être dépendantes de la durée et de la force de la perturbation.

2.1 Des histoires de vie différentes

Tous les individus d'une lignée ont été élevés dans un même bassin jusqu'à l'acclimatation. A ce stade, les seules différences de phénotype intra-lignée sont donc le reflet d'évènements non-contrôlés et aléatoires apparus aux cours de la vie des animaux ou d'expressions génétiques stochastiques (Kærn et al., 2005; Rea et al., 2005). En les transférant dans les bacs expérimentaux, des groupes d'individus phénotypiquement légèrement différents sont donc formés. Chaque bac contient donc un environnement social différent. Or, il est maintenant globalement admis que les interactions sociales représentent des facteurs environnementaux importants subis par les individus (Agrawal, 2001; Moore et al., 1997). On peut donc s'attendre à une augmentation forte de la variabilité phénotypique liée à l'acclimatation dans les bacs expérimentaux (Figure 43).

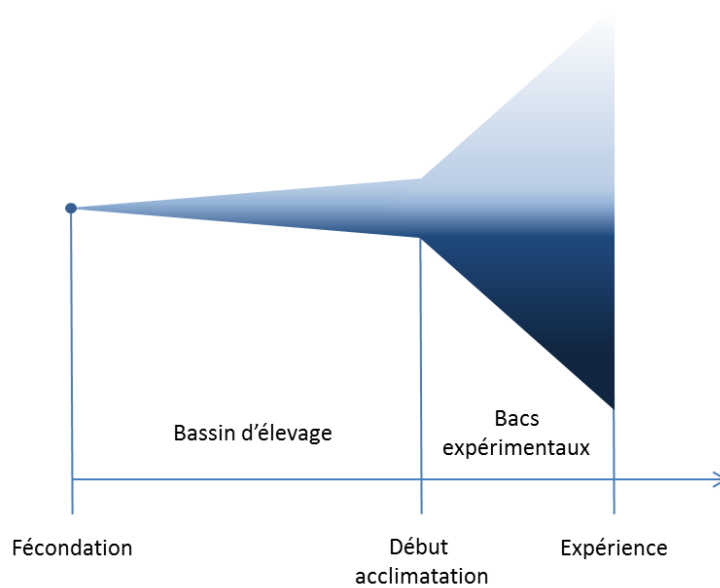


Figure 43. Effet des stades d'élevage avant l'expérience sur le champ des phénotypes possible (variances de bleu) pour une lignée isogénique.

Au sein du bassin d'élevage, la variabilité des phénotypes est faible. La mise en bacs expérimentaux pour acclimation favorise la diversité des phénotypes.

Les différences phénotypiques entre bacs d'une même lignée peuvent donc être attribuées à l'histoire de vie des poissons, incluant les événements aléatoires durant l'élevage en bassins et en bacs expérimentaux, mais également les interactions sociales durant l'acclimation. Dans ce sens, il a, par exemple, été montré qu'un stress social chronique pouvait avoir un impact sur la capacité des truites à répondre à un stress aigu supplémentaire (Barcellos et al., 1999a; Thomas and Gilmour, 2012). Or dans nos expériences, nous avons mesuré des différences intra-lignée importantes d'agressivité entre les bacs. Les interactions sociales entre individus sont donc très variables entre les différents bacs. Les variabilités intra-lignée de réponses au challenge aigu peuvent donc potentiellement s'expliquer par des interactions sociales (agonistiques ou autres).

2.2 Les niveaux d'action des différences d'histoire de vie

Chaque bac d'une même lignée isogénique présente donc une histoire de vie particulière. Etant donné la variabilité génotypique nulle intra-lignée, cette histoire de vie est nécessairement la cause principale des variabilités phénotypiques entre les bacs et donc des variabilités de réponses face à une perturbation intra-lignée. Nous avons vu, dans le modèle conceptuel développé en introduction de ce manuscrit, que l'histoire de vie (inclue dans la « boîte » environnement) pouvait avoir un impact direct sur les capacités à faire face de l'animal. En effet, l'histoire de vie peut par exemple affecter la résistance ou la capacité à

recupérer d'un organisme. Ainsi, il a, par exemple, été montré qu'une perturbation chronique a pour conséquence une dérégulation de l'axe HPI qui entraîne son hypo- ou hyper- réactivité selon les espèces et les perturbations utilisées (Hontela et al., 1992; Pickering and Pottinger, 1989; Wilson, 1998). Il s'agit donc d'une modification des capacités à faire face de l'organisme.

Nous proposons un autre niveau d'action de l'histoire de vie, celui de la perception de la perturbation (Figure 44). En effet, il est possible que certaines perturbations soient perçues différemment suivant l'histoire de vie de l'animal. Le système nerveux central peut interpréter une même perturbation de différentes façons en fonction de l'histoire de vie de l'animal, notamment lors d'une habitude à la perturbation. Ainsi, les études sur le stress montrent que c'est la façon dont l'animal perçoit son environnement qui est à l'origine de la réponse et non pas l'environnement lui-même (Boissy et al., 2007). C'est le traitement de l'information par la voie cognitive et la représentation mentale qu'il se fait de l'évènement perturbateur qui influencerait donc sur le degré de perturbation de l'animal.

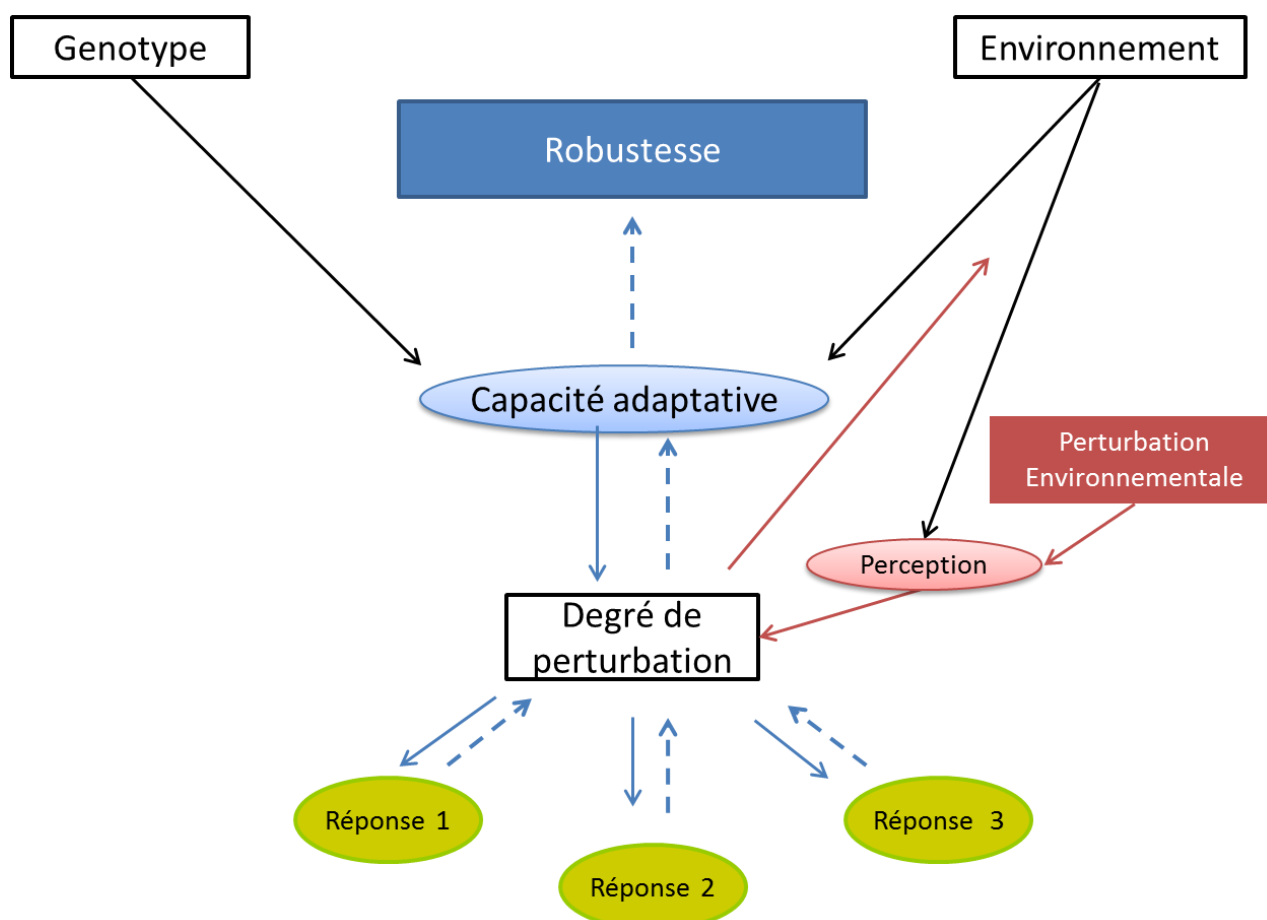


Figure 44. Approche hiérarchique pour décrire la robustesse incluant la perception et les niveaux d'action de l'histoire de vie.

2.3 Ce que traduit une forte variabilité du degré de perturbation

La plasticité phénotypique d'un génotype est définie comme la variation du phénotype en fonction de différents environnements (Via et al., 1995). Elle s'illustre généralement à travers une norme de réaction qui est la fonction reliant différents environnements et les phénotypes qui peuvent être produits par ce génotype (Pigliucci, 2001). Un génotype plastique est celui qui montre le plus de différences phénotypiques entre les différents environnements.

Chacun de nos bacs peut être considéré comme un environnement différent puisque les interactions sociales sont différentes et les individus qui les composent également. La variabilité d'un phénotype entre les bacs d'une même lignée peut donc être interprétée comme la plasticité phénotypique de la lignée. En considérant le degré de perturbation comme un phénotype, il est envisageable de décrire une norme de réaction qui relie le degré de perturbation de chacun des bacs d'une lignée isogénique avec les différents bacs, considérés comme différents environnements (Figure 45). Selon la définition de la plasticité phénotypique, le génotype de gauche présente donc une plasticité phénotypique plus importante que celui de droite (Figure 45). Se pose cependant la question de l'intérêt d'une telle plasticité du degré de perturbation.

La plasticité phénotypique est généralement considérée comme un avantage pour s'adapter à des milieux variés. Cependant, en s'intéressant au poids en élevage, elle peut être considérée comme décrivant une plus forte sensibilité à l'environnement (Dupont-Nivet et al., 2009) et donc une plus faible robustesse (Knap, 2009). Étudier la variabilité du degré de perturbation dans un contexte de plasticité phénotypique est très particulier puisqu'il s'agit de décrire la plasticité d'un phénotype qui intègre la plasticité adaptative face à une perturbation. Il est ainsi important de noter qu'un génotype présentant une forte variabilité du degré de perturbation peut présenter une moyenne de degré de perturbation forte (Figure 45, droite), c'est-à-dire une plasticité adaptative importante face à une perturbation aiguë.

La plasticité phénotypique est donc à interpréter de façon indépendante de la plasticité adaptative face à une perturbation donnée.

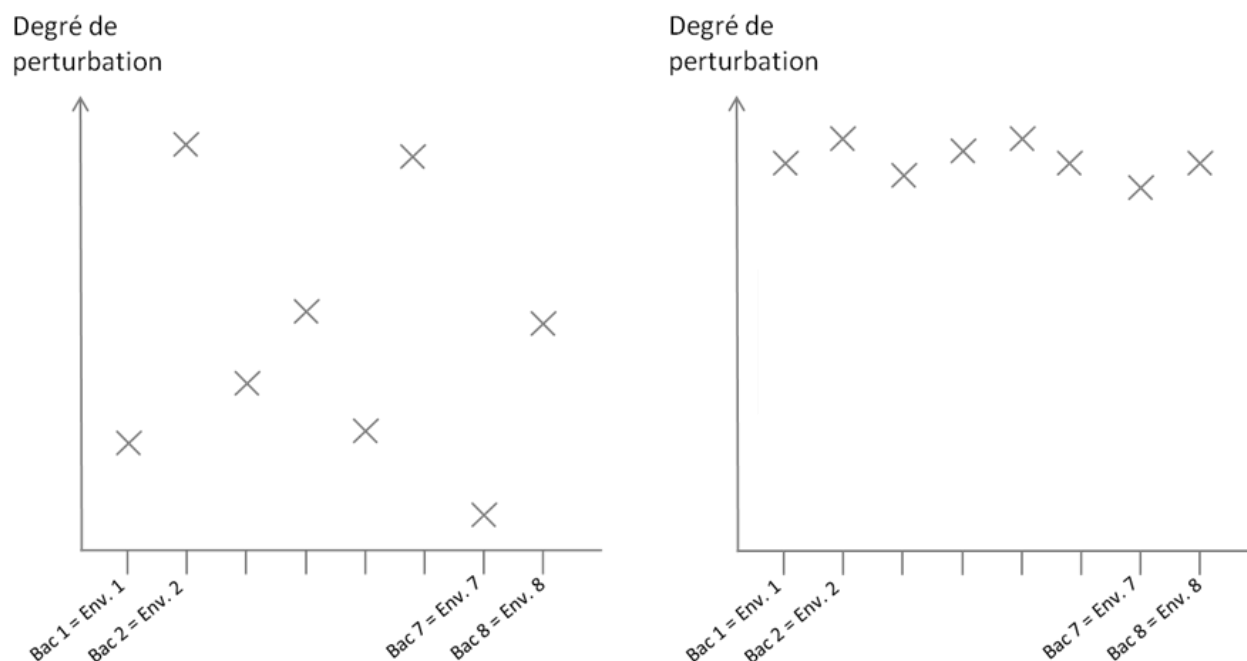


Figure 45. Une lignée présentant une forte variabilité des degrés de perturbation (gauche) et une lignée présentant peu de variations des degrés de perturbation (droite).

3 Approche de modélisation, limites et perspectives

La caractérisation des cinétiques de réponse a été réalisée dans les chapitres 2 et 3 à l'aide d'outils statistiques analysant de façon indépendante les périodes de réponse à la perturbation puis de récupération de la perturbation. Cette analyse a permis d'apporter des informations intéressantes quant à la relation entre les réponses et à la variabilité inter et intra-lignée isogénique. Cependant, cette méthode séquentielle entraîne nécessairement une perte d'information relative au lien entre l'amplitude de réponse et la capacité à récupérer de la perturbation mais surtout n'apporte pas de mesure compréhensive de la capacité adaptative de l'animal.

Le modèle du ressort-amorti décrit dans cette thèse a permis de mettre en évidence des caractéristiques de résistance et de capacité à récupérer à partir de cinétiques complètes de réponses ayant des échelles absolues très différentes (comportementales et physiologiques). Ce modèle reste très simple et forme une bonne base pour un modèle plus complexe capable d'intégrer de nouvelles composantes de la robustesse.

3.1 Perfectionnement du modèle

3.1.1 *Prendre en compte l'acclimatation pendant le challenge*

En l'état, le modèle ne peut s'ajuster qu'à des augmentations ou diminutions de réponses pendant le challenge puis à des retours à l'état initial après le challenge. Il s'agit là des cinétiques de réponses classiques face à une perturbation environnementale rapide et de courte durée. Les perturbations de 4 heures que nous avons réalisées sont généralement considérées comme des perturbations aiguës. Le modèle est donc a priori tout à fait adapté. Cependant, les courbes de réponses démontrent une capacité des animaux à s'acclimater à la perturbation. En effet, la lignée R montre, par exemple, durant le confinement une diminution de la concentration en cortisol (voir chapitre 2). De la même façon durant la perturbation hypercapnique, les deux lignées montrent une diminution de la production de cortisol (voir chapitre 3). Les données comportementales pendant le challenge hypercapnique indiquent également un retour à l'état initial durant la perturbation. Il faut donc tenir compte du fait que les animaux peuvent s'acclimater pendant les perturbations environnementales choisies ici. Le modèle que nous avons proposé perd par conséquent beaucoup d'information avec un ajustement aux cinétiques approximatif.

Il paraît donc important dans un futur proche d'ajouter au modèle une composante d'acclimatation afin qu'il puisse s'ajuster aux réponses face à une perturbation de plus longue durée ou même à un stress chronique. L'une des solutions pouvant permettre d'intégrer cette composante est de faire varier la perception que l'animal se fait de la perturbation durant la perturbation.

3.1.2 *Considérer la perception comme un paramètre variable*

Nous avons vu que la perception avait potentiellement un rôle dans l'effet du challenge sur le système. Notre modèle inclut déjà un paramètre perception capable de moduler la force de la perturbation sur le système. Ce paramètre pourrait être utilisé pour décrire la capacité d'acclimatation du système à une perturbation continue. Nous pouvons, en effet, faire l'hypothèse que la perception d'un challenge diminue lorsque celui-ci dure dans le temps. A chaque changement d'environnement (lors d'une perturbation par exemple) la perception serait initialement très forte puis diminuerait dans le temps (Figure 46).

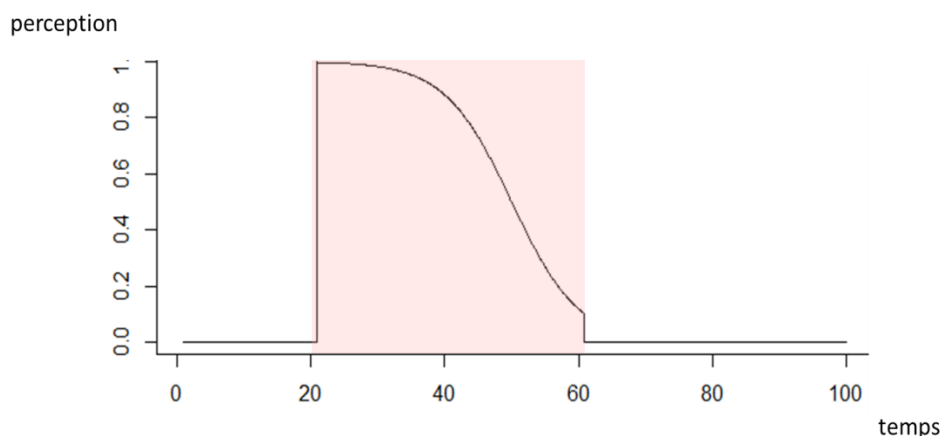


Figure 46. Proposition de la décroissance dans le temps de la perception durant une perturbation (carré rouge)

La capacité d'acclimation du système serait alors calculée par la vitesse de réduction de la perception dans le temps. La Figure 47 représente les simulations de réponses d'un système avec une capacité d'acclimation nulle (perception égale à 1 durant toute la période du challenge) et d'un système avec une capacité d'acclimation forte, c'est-à-dire avec une perception du challenge qui décroît dans le temps.

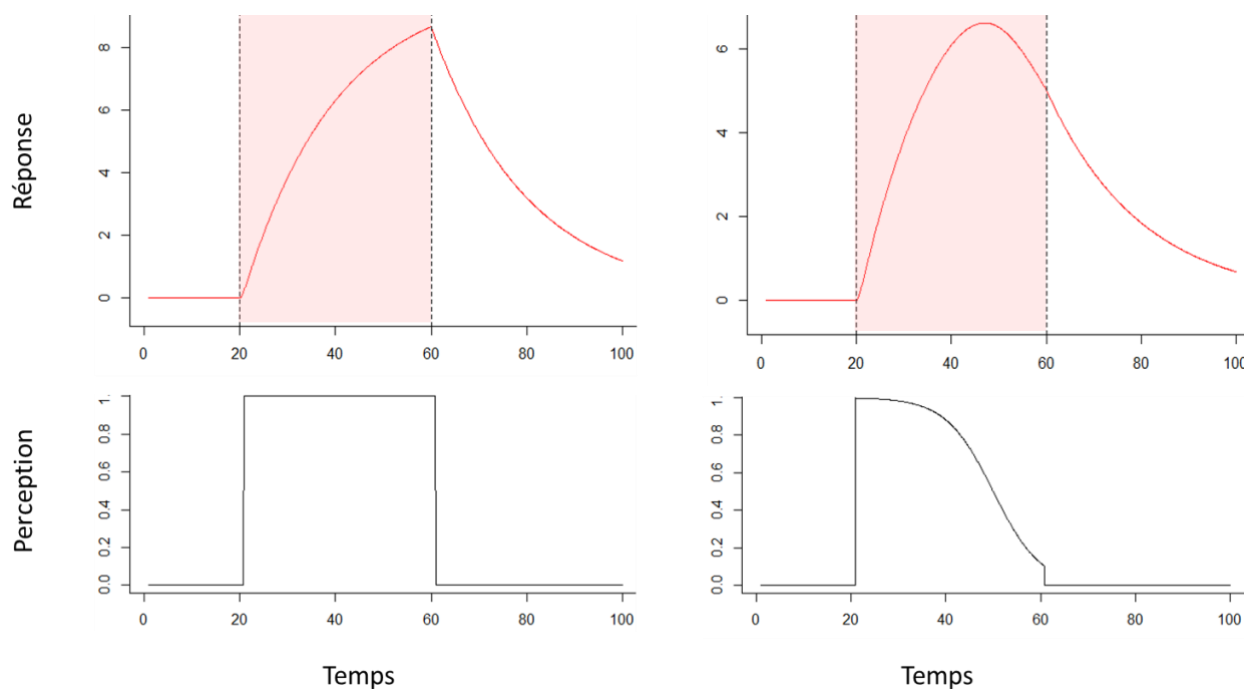


Figure 47. Différence de réponse à une perturbation entre un système dont la perception reste constante durant la perturbation (gauche) et un système dont la perception varie (droite).

3.1.3 Les perturbations répétées

Nous nous sommes intéressés durant ce projet à la capacité à faire face à une perturbation unique. Or, à long terme la capacité à faire face des individus est également liée à leur capacité à apprendre et à mieux faire face lors de la prochaine occurrence. Certaines études montrent par exemple que les réponses à une perturbation diminuent avec la répétition de cette perturbation. Ce phénomène appelé habituation est très connu chez le rat (Bhatnagar et al., 2002; Cole et al., 2000; Grissom and Bhatnagar, 2009) et a été démontré chez certaines espèces de poissons (Barcellos et al., 1999b; Barton et al., 1987). Dans ces expériences, le fait de répéter à intervalle constant une même expérience entraîne une atténuation de la réponse endocrinienne. Cependant, suivant les espèces ou les conditions d'expérimentation, certains individus ne montrent pas cette capacité (Koakoski et al., 2013) ou même montre le phénomène inverse, appelé accumulation, avec une plus forte réponse à la perturbation après avoir été soumis de façon répétée à la perturbation (Ellis et al., 2004b). Il semble donc intéressant d'intégrer dans le modèle ces notions d'habituation et d'accumulation face à une perturbation répétée. Cette nouvelle composante du système pourra alors être estimée et quantifiée et apportera des éléments de réponse quant à la robustesse de l'animal. Nous faisons ainsi l'hypothèse qu'une forte capacité d'habituation est un critère de robustesse à prendre en compte car elle permet à terme de devenir résistant à la perturbation. Une possibilité de prendre en compte ces phénomènes est de faire varier la résistance et/ou la capacité à récupérer (K et/ou C) lorsque les perturbations sont répétées ou additionnées. Il est notamment possible d'envisager une résistance K qui augmente (phénomène d'habituation) avec le nombre de répétitions d'une même perturbation (voir Figure 48). Un individu qui présenterait une forte habituation serait un individu dont le K augmente plus fortement au fil des répétitions. La Figure 48 présente les réponses pour un système (gauche) montrant une meilleure capacité d'habituation comparé au système de droite ; les deux systèmes montrant pourtant une première réponse à la perturbation ($n=0$) identique. Comparer les deux systèmes pour leur capacité d'habituation consisterait alors à décrire la cinétique de K en fonction du nombre de répétitions.

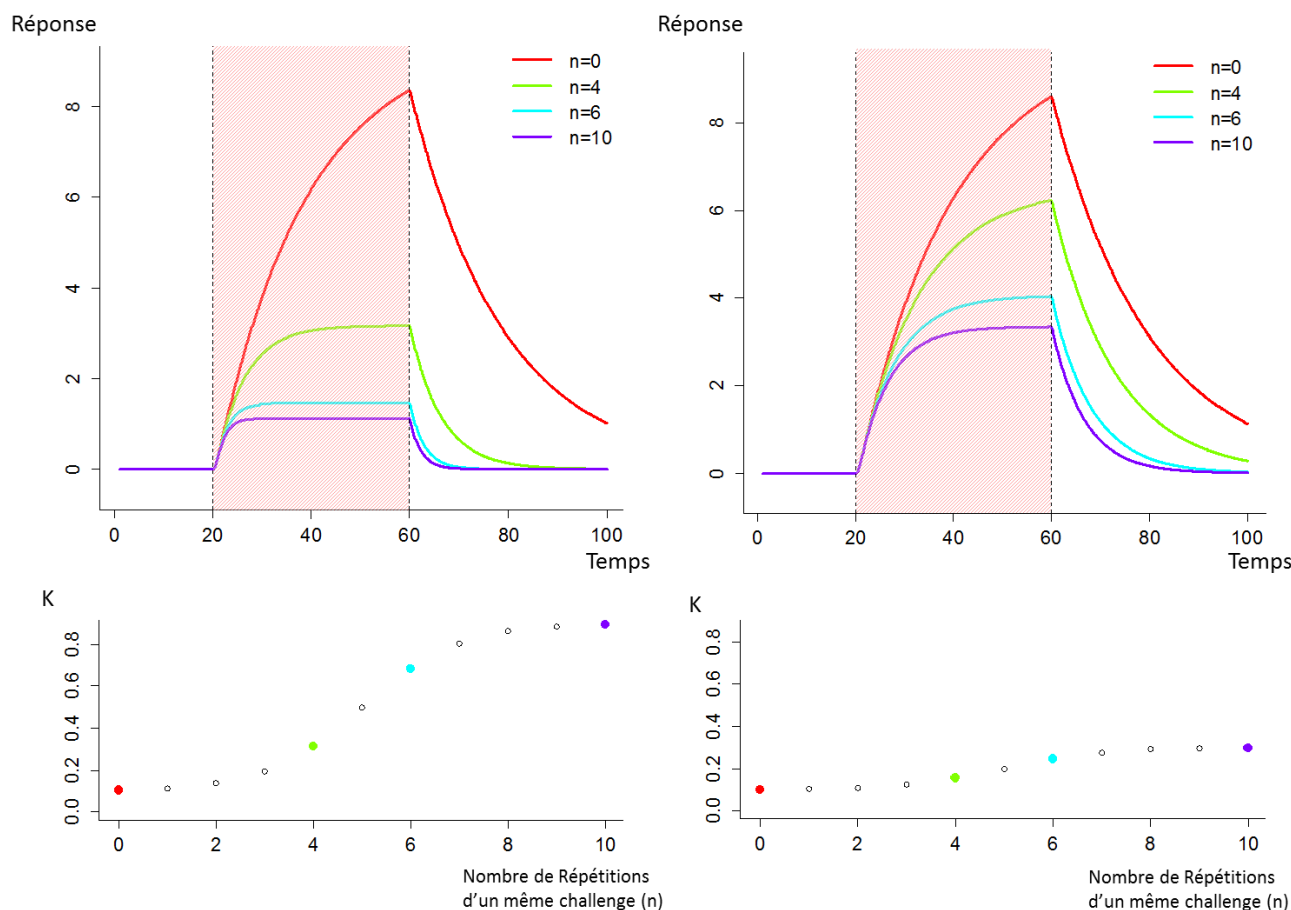


Figure 48. Exemples de sorties de modèle pour des réponses à une perturbation (période rouge) lorsque la perturbation est répétée n fois d’affilé chez deux systèmes présentant des capacités d’habituations différentes.

Les graphiques supérieurs décrivent les réponses potentielles suivant le nombre (n) de challenges précédemment subis chez un individu présentant une bonne capacité d’habituations (gauche) comparé à un individu présentant une moins bonne capacité d’habituations (droite). Leur capacité d’habituations peut être évaluée en fonction de la cinétique de la résistance K du système en fonction du nombre de répétitions de la perturbation (graphique inférieur).

3.2 Perspectives

3.2.1 Quantifier de nouveaux éléments de la robustesse

Dans ce travail nous avons été capables de décrire la capacité des individus à faire face à une perturbation aiguë, et donc d’apporter des éléments de réponse quant à leur robustesse. Le modèle mis en place permet de faciliter cette description et d’en augmenter la précision. A terme, il semble envisageable de le complexifier en ajoutant les composantes d’acclimatation à une perturbation de longue durée et d’habituations à une perturbation répétée. Ce modèle amélioré permettra de caractériser sur des expériences de stress chronique ou répété ces deux caractéristiques qui sont, de notre point de vue, des composantes importantes de la robustesse.

Décrire la robustesse nécessitera donc de mesurer le degré de perturbation de l'animal face à une perturbation aiguë (comme réalisé durant le projet de thèse), mais également de réaliser des expériences de stress prolongé afin d'évaluer la capacité d'acclimatation et enfin de conduire des expériences de stress répété pour évaluer la capacité d'habituation de l'animal. L'intégration de ces 3 critères apportera une caractérisation fine de la robustesse de l'animal.

3.2.2 Extraire et quantifier des capacités d'adaptation à partir de données en élevage

Au cours de ce projet de thèse, les individus ont été caractérisés en appliquant une perturbation artificielle pouvant être considérée comme non-représentative de ce qu'il se passe réellement en élevage. Les poissons sont en effet rarement placés dans une épuisette durant 4 heures. De la même façon, l'éleveur intervient généralement sur ses installations avant que ses poissons ne subissent 4 heures d'eau enrichie en CO₂. L'idéal serait donc de quantifier la capacité des poissons à faire face à des perturbations qu'ils risquent de rencontrer en élevage ou, idéalement, des perturbations qu'ils rencontrent réellement. Pour cela, il paraît intéressant d'être capable de suivre au cours du temps de façon non invasive, peu coûteuse et automatique les réponses des poissons aux perturbations réelles qu'ils subissent dans le bassin d'élevage. Dans ce sens, de nouveaux systèmes de capteurs biologiques miniatures et transportables sont actuellement en cours de développement pour certaines espèces aquacoles, avec quelques systèmes déjà au point pour certaines mesures physiologiques de réponses à une perturbation (Endo et al., 2009; Hibi et al., 2012; Takase et al., 2014; Wu et al.). A terme, le but de ces recherches est de pouvoir équiper quelques poissons représentatifs du bassin d'élevage, appelés poissons sentinelles, et fournissant en direct et en continu des données comportementales et physiologiques en lien avec les mécanismes adaptatifs.

Ces capteurs biologiques vont générer d'importantes quantités de données temporelles dans des conditions normales d'élevage, où les poissons doivent faire face à des perturbations non-contrôlées de leur environnement. A l'aide d'outils statistiques et d'outils de modélisation, de telles cinétiques pourraient apporter d'importantes informations sur les capacités d'adaptation des individus. La première étape d'une telle approche consisterait à identifier et extraire des données temporelles les périodes de perturbation et de récupération. Puis dans un deuxième temps, le modèle développé dans ce projet et amélioré permettrait de faire ressortir les caractéristiques de résistance et de capacité à récupérer de ces périodes.

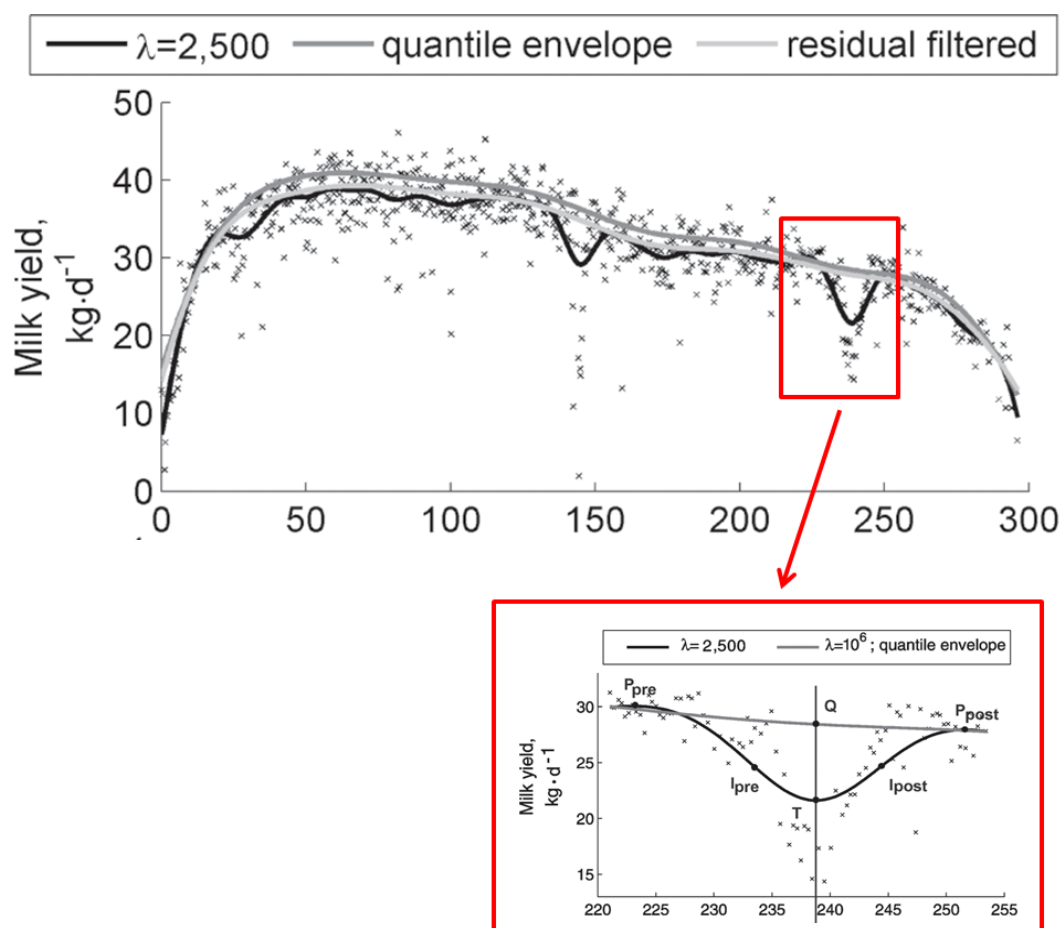


Figure 49. Lissages différentiels d'une courbe de rendement laitier permettant d'extraire les périodes de perturbation.

Suivant la force de lissage, il est possible d'obtenir une courbe de phénotype non perturbé (quantile envelope) ainsi qu'une courbe plus proche des données capturant les écarts à ce phénotype ($\lambda=2,500$). Adapté de Codrea et al. (2011)

Une récente étude a proposé une méthode permettant de répondre à l'étape 1 décrite précédemment (Codrea et al., 2011). En analysant des cinétiques de rendement en lait de vaches suivies durant 1 année, cette étude montre qu'il est possible grâce à des outils de lissage différentiel de courbe de faire ressortir les événements perturbants (Figure 49).

Il est important de noter que les cinétiques de réponse lors de la perturbation ressemblent fortement aux cinétiques obtenues par le modèle du ressort amorti qui pourraient donc permettre d'en extraire une valeur de résistance K et de capacité à récupérer C .

3.2.3 Amélioration de la robustesse par sélection ou par contrôle précoce de l'histoire de vie ?

A l'aide de capteurs de données physiologiques et comportementales, d'une méthode d'extraction des périodes de perturbation, d'un modèle ressort-amorti amélioré, et d'un modèle hiérarchique intégrant ces caractéristiques, il semble envisageable de décrire à grande échelle la robustesse des animaux dans des conditions normales d'élevage. Ces outils permettront d'identifier les individus décrits comme robustes aux perturbations classiques d'élevage. Des études à grande échelle seront envisageables afin d'évaluer l'héritabilité de ces caractéristiques de robustesse chez les espèces aquacoles. La forte variabilité intra-lignée observée dans nos études, ainsi que la faible différence moyenne entre les deux lignées semblent indiquer une robustesse faiblement liée aux gènes. L'histoire de vie semble, au contraire, jouer un rôle tout particulier.

Les études devront donc chercher à identifier quels facteurs peuvent améliorer à long terme la robustesse, et à quels moments de l'histoire de vie ils doivent être appliqués.

BIBLIOGRAPHIE

GENERALE

A

- Adger, W.N. (2006). Vulnerability. *Glob. Environ. Change* 16, 268–281.
- Agrawal, A.A. (2001). Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* 294, 321–326.
- Ali, A., and Cheng, K.M. (1985). Early egg production in genetically blind (rc/rc) chickens in comparison with sighted (Rc+/rc) controls. *Poult. Sci.* 64, 789–794.
- Almazán-Rueda, P., Van Helmond, A.T.M., Verreth, J. a. J., and Schrama, J.W. (2005). Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. *J. Fish Biol.* 67, 1029–1039.
- ANR (2013). BIOADAPT - Adaptation : des gènes aux populations. Génétique et biologie de l'adaptation aux stress et aux perturbations | ANR - Agence Nationale de la Recherche.
- Ashley, P.J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 199–235.
- Atchison, G.J., Henry, M.G., and Sandheinrich, M.B. (1987). Effects of metals on fish behavior: a review. *Environ. Biol. Fishes* 18, 11–25.
- Auperin, B., and Boeuf, G. (2010). Adaptation et stress. In *La Truite Arc-En-Ciel. De La Biologie À L'élevage*, (B. Jalabert, A. Fostier), pp. 83–100.
- Auperin, B., and Geslin, M. (2008). Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 234–239.
- Auperin, B., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Fostier, A., and Prunet, P. (1997). Effect of Confinement Stress on Circulating Levels of Growth Hormone and Two Prolactins in Freshwater-Adapted Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 35–44.

B

- Baracos, V.E., Whitmore, W.T., and Gale, R. (1987). The metabolic cost of fever. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 1248–1254.
- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., De Souza, S.M.G., and Lulhier, F. (1999a). The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquac. Res.* 30, 887–892.
- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., De Souza, S.M.G., and Lulhier, F. (1999b). Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquac. Res.* 30, 437–444.

- Barry, M.J. (2012). Application of a novel open-source program for measuring the effects of toxicants on the swimming behavior of large groups of unmarked fish. *Chemosphere* 86, 938–944.
- Barton, B.A., and Iwama, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.
- Barton, B.A., Schreck, C.B., and Barton, L.D. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Aquat Org* 2, 173–185.
- Bégout, M.-L., Kadri, S., Huntingford, F., and Damsgård, B. (2012). Tools for Studying the Behaviour of Farmed Fish. In *Aquaculture and Behavior*, F. Huntingford, Icolm Jobling, and S. Kadri, eds. (Wiley-Blackwell), pp. 65–86.
- Bégout Anras, M.-L., and Lagardère, J.P. (2004). Measuring cultured fish swimming behaviour: first results on rainbow trout using acoustic telemetry in tanks. *Aquaculture* 240, 175–186.
- Beilharz, R.G., Luxford, B.G., and Wilkinson, J.L. (1993). Quantitative genetics and evolution: Is our understanding of genetics sufficient to explain evolution? *J. Anim. Breed. Genet. Z. Für Tierz. Zücht.* 110, 161–170.
- Bentham, J. (1789). *An Introduction to the Principles of Morals and Legislation* (W. Pickering).
- Berenbrink, M. (2000). Haemoglobin function and the evolution of adrenoresponses in lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126, *Supplement 1*, S10.
- Bhatnagar, S., and Dallman, M. (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 84, 1025–1039.
- Bhatnagar, S., Huber, R., Nowak, N., and Trotter, P. (2002). Lesions of the Posterior Paraventricular Thalamus Block Habituation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Repeated Restraint. *J. Neuroendocrinol.* 14, 403–410.
- Blanc, F., Dumont, B., Brunschwig, G., Bocquier, F., and Agabriel, J. (2010). Robustesse, flexibilité, plasticité: des processus adaptatifs révélés dans les systèmes d'élevage extensifs de ruminants. *Prod. Anim.* 23, 65–80.
- Blanc, F., Ollion, E., Puillet, L., Delaby, L., Ingrand, S., Tichit, M., and Friggens, N.C. (2013). Evaluation quantitative de la robustesse des animaux et du troupeau : quels principes retenir ? In *20èmes Rencontres Recherches Ruminants*, (Paris, France: INRA. Institut de l'Élevage), pp. 265–272.
- Blundell, J., de Graaf, C., Hulshof, T., Jebb, S., Livingstone, B., Lluch, A., Mela, D., Salah, S., Schuring, E., van der Knaap, H., et al. (2010). Appetite control: methodological aspects of the evaluation of foods. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 11, 251–270.

- Boeuf, G. (1993a). Seawater adaptation strategies in salmonids. In *Coastal and Estuarine Studies*, B. Lahlou, and P. Vitiello, eds. (Washington, D. C.: American Geophysical Union), pp. 61–80.
- Boeuf, G. (1993b). Salmonid smolting: a pre-adaptation to the oceanic environment. In *Fish Ecophysiology*, J.C. Rankin, and F.B. Jensen, eds. (Springer Netherlands), pp. 105–135.
- Bœuf, G., and Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 130, 411–423.
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M.B., Moe, R.O., Spruijt, B., Keeling, L.J., Winckler, C., Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., et al. (2007). Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol. Behav.* 92, 375–397.
- Bonga, S.E.W. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.
- Braastad, B.O. (1998). Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 61, 159–180.
- Bratland, S., Stien, L.H., Braithwaite, V.A., Juell, J.-E., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Fosseidengen, J.E., and Kristiansen, T.S. (2010). From fright to anticipation: using aversive light stimuli to investigate reward conditioning in large groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquac. Int.* 18, 991–1001.
- Brelín, D., Petersson, E., and Winberg, S. (2005). Divergent Stress Coping Styles in Juvenile Brown Trout (*Salmo trutta*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 239–245.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., and Klaminder, J. (2013). Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339, 814–815.
- Bui, S., Oppedal, F., Korsøen, Ø.J., Sonny, D., and Dempster, T. (2013). Group Behavioural Responses of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) to Light, Infrasound and Sound Stimuli. *PLoS ONE* 8, e63696.
- Butail, S., and Paley, D.A. (2012). Three-dimensional reconstruction of the fast-start swimming kinematics of densely schooling fish. *J. R. Soc. Interface* 9, 77–88.

C

- Calandreau, L., Bertin, A., Boissy, A., Arnould, C., Constantin, P., Desmedt, A., Guémené, D., Nowak, R., and Leterrier, C. (2011). Effect of one week of stress on emotional reactivity and learning and memory performances in Japanese quail. *Behav. Brain Res.* 217, 104–110.
- Carlson, J.M., and Doyle, J. (2002). Complexity and robustness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 Suppl 1, 2538–2545.

- Christensen, K.A., Brunelli, J.P., Wheeler, P.A., and Thorgaard, G.H. (2014). Antipredator Behavior QTL: Differences in Rainbow Trout Clonal Lines Derived from Wild and Hatchery Populations. *Behav. Genet.* 1–12.
- Clark, J.A.M., Potter, M., and Harding, E. (2006). The welfare implications of animal breeding and breeding technologies in commercial agriculture. *Livest. Sci.* 103, 270–281.
- Codrea, M.C., Højsgaard, S., and Friggens, N.C. (2011). Differential smoothing of time-series measurements to identify disturbances in performance and quantify animal response characteristics: An example using milk yield profiles in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 89, 3089–3098.
- Cole, M.A., Kalman, B.A., Pace, T.W.W., Topczewski, F., Lowrey, M.J., and Spencer, R.L. (2000). Selective Blockade of the Mineralocorticoid Receptor Impairs Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Expression of Habituation. *J. Neuroendocrinol.* 12, 1034–1042.
- Colléter, M., and Brown, C. (2011). Personality traits predict hierarchy rank in male rainbowfish social groups. *Anim. Behav.* 81, 1231–1237.
- Conte, F.. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205–223.
- Conti, S.G., Roux, P., Fauvel, C., Maurer, B.D., and Demer, D.A. (2006). Acoustical monitoring of fish density, behavior, and growth rate in a tank. *Aquaculture* 251, 314–323.
- Cote, J., Fogarty, S., Brodin, T., Weinersmith, K., and Sih, A. (2010). Personality-dependent dispersal in the invasive mosquitofish: group composition matters. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* rspb20101892.
- Crocker, C.E., Farrell, A.P., Gamperl, A.K., and Joseph J. Cech, J. (2000). Cardiorespiratory responses of white sturgeon to environmental hypercapnia. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R617–R628.
- Croft, D.P., Krause, J., Darden, S.K., Ramnarine, I.W., Faria, J.J., and James, R. (2009). Behavioural trait assortment in a social network: patterns and implications. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63, 1495–1503.
- Croke, S.J., and McDonald, D.G. (2002). The further development of ionoregulatory measures as biomarkers of sensitivity and effect in fish species. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 21, 1683–1691.
- Cruz-Neto, A.P., and Steffensen, J.F. (1997). The effects of acute hypoxia and hypercapnia on oxygen consumption of the freshwater European eel. *J. Fish Biol.* 50, 759–769.
- Csete, M.E., and Doyle, J.C. (2002). Reverse Engineering of Biological Complexity. *Science* 295, 1664–1669.

D

- Delcourt, J., Becco, C., Vandewalle, N., and Poncin, P. (2009). A video multitracking system for quantification of individual behavior in a large fish shoal: Advantages and limits. *Behav. Res. Methods* 41, 228–235.
- Dobrákovová, M., Kvetňanský, R., Opršalová, Z., and Ježová, D. (1993). Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rats. *Psychoneuroendocrinology* 18, 163–174.
- Doupé, R.G., Partridge, G.J., and Lymbery, A.J. (2003). Visible implant fluorescent elastomer tags as pedigree markers for applied aquaculture: an evaluation using black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Aquac. Res.* 34, 681–683.
- Drangsholt, T.M.K., Damsgård, B., and Olesen, I. (2014). Quantitative genetics of behavioral responsiveness in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 420–421, 282–287.
- Dror, M., Sinyakov, M.S., Okun, E., Dym, M., Sredni, B., and Avtalion, R.R. (2006). Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 279–287.
- Duarte, S., Reig, L., Masalo, I., Blanco, M., and Oca, J. (2011). Influence of tank geometry and flow pattern in fish distribution. *Aquac. Eng.* 44, 48–54.
- Dumont, B., González-García, E., Thomas, M., Fortun-Lamothe, L., Ducrot, C., Dourmad, J.Y., and Tichit, M. (2014). Forty research issues for the redesign of animal production systems in the 21st century. *Animal* 8, 1382–1393.
- Dupont-Nivet, M., Médale, F., Leonard, J., Le Guillou, S., Tiquet, F., Quillet, E., and Geurden, I. (2009). Evidence of genotype–diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture* 295, 15–21.
- De Goede, D.M., Gremmen, B., and Blom-Zandstra, M. (2013). Robust agriculture: Balancing between vulnerability and stability. *NJAS - Wagening. J. Life Sci.* 64–65, 1–7.

E

- EFSA (2008). Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare.
- Eissa, B.L., Ossana, N.A., Ferrari, L., and Salibián, A. (2010). Quantitative Behavioral Parameters as Toxicity Biomarkers: Fish Responses to Waterborne Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 1032–1039.

- Ellen, E.D., Star, L., Uitdehaag, K., and Brom, F.W.A. (2009a). Robustness as a breeding goal and its relation with health, welfare and integrity. EAAP Publ. No126 45–53.
- Ellen, E.D., Star, L., Uitdehaag, K., Brom, F.W.A., Klopčič, M., Reents, R., Philipsson, J., and Kuipers, A. (2009b). Robustness as a breeding goal and its relation with health, welfare and integrity. 45–53.
- Ellis, T., James, J.D., Stewart, C., and Scott, A.P. (2004a). A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *J. Fish Biol.* 65, 1233–1252.
- Ellis, T., James, J., Stewart, C., and Scott, A. (2004b). A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *J. Fish Biol.* 65, 1233–1252.
- Ellis, T., James, J., and Scott, A. (2005). Branchial release of free cortisol and melatonin by rainbow trout. *J. Fish Biol.* 67, 535–540.
- Endo, H., Yonemori, Y., Hibi, K., Ren, H., Hayashi, T., Tsugawa, W., and Sode, K. (2009). Wireless enzyme sensor system for real-time monitoring of blood glucose levels in fish. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1417–1423.
- Espmark, Å.M., and Baeverfjord, G. (2009). Effects of hyperoxia on behavioural and physiological variables in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquac. Int.* 17, 341–353.
- Evans, D.H., and Claiborne, J.B. (2005). *The Physiology of Fishes*, Third Edition (CRC Press).

F

- FABRETP (2011).
<http://www.fabretp.info/LinkClick.aspx?fileticket=8nfaFBKhUqE%3d&tabid=219&mid=649>
- FAO, F. (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), FishStat, Aquaculture production.
- Faucher, K., Parmentier, E., Becco, C., Vandewalle, N., and Vandewalle, P. (2010). Fish lateral system is required for accurate control of shoaling behaviour. *Anim. Behav.* 79, 679–687.
- Félix, M.-A., and Wagner, A. (2006). Robustness and evolution: concepts, insights and challenges from a developmental model system. *Heredity* 100, 132–140.
- Fertuck, K.C., Eckel, J.E., Gennings, C., and Zacharewski, T.R. (2003). Identification of temporal patterns of gene expression in the uteri of immature, ovariectomized mice following exposure to ethynylestradiol. *Physiol. Genomics* 15, 127–141.

- Finstad, B., Staurnes, M., and Reite, O.B. (1988). Effect of low temperature on sea-water tolerance in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 72, 319–328.
- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Kløften, H., Ski, H., and Stefansson, S. (1999). Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture* 178, 171–187.
- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Åsgård, T., Baeverfjord, G., Rasmussen, T., Vindheim, T., and Stefansson, S. (2003). Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture* 215, 301–319.
- Folkedal, O., Stien, L.H., Torgersen, T., Oppedal, F., Olsen, R.E., Fosseidengen, J.E., Braithwaite, V.A., and Kristiansen, T.S. (2012a). Food anticipatory behaviour as an indicator of stress response and recovery in Atlantic salmon post-smolt after exposure to acute temperature fluctuation. *Physiol. Behav.* 105, 350–356.
- Folkedal, O., Torgersen, T., Olsen, R.E., Fernö, A., Nilsson, J., Oppedal, F., Stien, L.H., Kristiansen, T.S., and Fernö, A. (2012b). Duration of effects of acute environmental changes on food anticipatory behaviour, feed intake, oxygen consumption, and cortisol release in Atlantic salmon parr. *Physiol. Behav.* 105, 283–291.
- Friggens, N.C., Codrea, M.C., and Højsgaard, S. (2011). Extracting biologically meaningful features from time-series measurements of individual animals: towards quantitative description of animal status. In *Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals*, D. Sauvant, J.V. Milgen, P. Faverdin, and N. Friggens, eds. (Wageningen Academic Publishers), pp. 40–48.

G

- Gallopín, G.C. (2006). Linkages between vulnerability, resilience, and adaptive capacity. *Glob. Environ. Change* 16, 293–303.
- Gamborg, C., and Sandøe, P. (2005). Sustainability in farm animal breeding: a review. *Livest. Prod. Sci.* 92, 221–231.
- Geffroy, B., and Bardonnnet, A. (2012). Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance. *Ecol. Freshw. Fish* 21, 469–482.
- Geffroy, B., Bru, N., Dossou-Gbété, S., Tentelier, C. and Bardonnnet, A. 2014. The Link between Social Network Density and Rank-Order Consistency of Aggressiveness in Juvenile Eels. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68, 1073-1083.
- Geurden, I., Cuvier, A., Gondouin, E., Olsen, R.E., Ruohonen, K., Kaushik, S., and Boujard, T. (2005). Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiol. Behav.* 85, 107–114.

- Geurden, I., Corraze, G., and Boujard, T. (2007). Self-feeding behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, offered diets with distinct feed oils. *Appl. Anim. Behav. Sci.* *108*, 313–326.
- Geurden, I., Borchert, P., Balasubramanian, M.N., Schrama, J.W., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Kaushik, S.J., Panserat, S., and Médale, F. (2013). The Positive Impact of the Early-Feeding of a Plant-Based Diet on Its Future Acceptance and Utilisation in Rainbow Trout. *PLoS ONE* *8*, e83162.
- Gilmour, K.M. (2001). The CO₂/pH ventilatory drive in fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *130*, 219–240.
- Good, C., Davidson, J., Welsh, C., Snekvik, K., and Summerfelt, S. (2010). The effects of carbon dioxide on performance and histopathology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in water recirculation aquaculture systems. *Aquac. Eng.* *42*, 51–56.
- Graham, M.S., Turner, J.D., and Wood, C.M. (1990). Control of ventilation in the hypercapnic skate *Raja ocellata*: I. Blood and extradural fluid. *Respir. Physiol.* *80*, 259–277.
- Greenwood, L., Scott, A., Vermeirssen, E., Mylonas, C., and Pavlidis, M. (2001). Plasma steroids in mature common dentex (*Dentex dentex*) stimulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Gen. Comp. Endocrinol.* *123*, 1–12.
- Grimsrud, K.M., Nielsen, H.M., Navrud, S., and Olesen, I. (2013). Households' willingness-to-pay for improved fish welfare in breeding programs for farmed Atlantic salmon. *Aquaculture* *372–375*, 19–27.
- Grissom, N., and Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiol. Learn. Mem.* *92*, 215–224.

H

- Hansen, J., Sato, M., and Ruedy, R. (2012). Public Perception of Climate Change and the New Climate Dice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, E2415–E2423.
- Hasler, C.T., Suski, C.D., Hanson, K.C., Cooke, S.J., Philipp, D.P., and Tufts, B.L. (2009). Effect of water temperature on laboratory swimming performance and natural activity levels of adult largemouth bass. *Can. J. Zool.* *87*, 589–596.
- Henry, M.G., and Atchison, G.J. (1984). Behavioral effects of methyl parathion on social groups of bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Environ. Toxicol. Chem.* *3*, 399–408.
- Hibi, K., Hatanaka, K., Takase, M., Ren, H., and Endo, H. (2012). Wireless Biosensor System for Real-Time L-Lactic Acid Monitoring in Fish. *Sensors* *12*, 6269–6281.
- Hoare, D., Couzin, I., Godin, and Krause, J. (2004). Context-dependent group size choice in fish. *Anim. Behav.* *67*, 155–164.

- Højsgaard, S., and Friggens, N.C. (2010). Quantifying degree of mastitis from common trends in a panel of indicators for mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 582–592.
- Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., and Chevalier, G. (1992). Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 278–283.
- Hosfeld, C.D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T.M., Waagbø, R., Olsen, A.B., Breck, O., Stefansson, S., and Fivelstad, S. (2008). Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 280, 146–153.
- Hu, Y., Ni, Q., Wu, Y., Zhang, Y., and Guan, C. (2011). Study on CO₂ removal method in recirculating aquaculture waters. *Procedia Eng.* 15, 4780–4789.
- Huchzermeyer, K.D.A. (2003). Clinical and pathological observations on *Streptococcus* sp. infection on South African trout farms with gas supersaturated water supplies. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 70, 95–105.
- Huntingford, F., Jobling, M., and Kadri, S. (2011). *Aquaculture and Behavior* (John Wiley & Sons).

I

- Ikuta, K., Shikama, T., Oda, S., and Okumoto, N. (1992). Acid tolerance of eyed embryos and larvae in salmonid fishes. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquac.*
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Lee, K.-S., Kikkawa, T., and Kita, J. (2005). Physiological effects on fishes in a high-CO₂ world. *J. Geophys. Res. Oceans* 110, C09S09.
- Isla Molleda, M. (2008). Water quality in recirculating aquaculture systems (ras) for arctic charr (*salvelinus alpinus* L.) culture.
- Israeli, D., and Kimmel, E. (1996). Monitoring the behavior of hypoxia-stressed *Carassius auratus* using computer vision. *Aquac. Eng.* 15, 423–440.
- Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., and Schreck, C.B. (1997). Fish stress and health in aquaculture.

J

- Johansson, D., Ruohonen, K., Juell, J.-E., and Oppedal, F. (2009). Swimming depth and thermal history of individual Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in production cages under different ambient temperature conditions. *Aquaculture* 290, 296–303.

Jordan, D.H.M., and Lloyd, R. (1964). The resistance of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson) and roach (*Rutilus rutilus* (L.)) to alkaline solutions. *Int J Air Wat Poll Pergamon Press* 8, 405–409.

Juell, J.-E., Oppedal, F., Boxaspen, K., and Taranger, G.L. (2003). Submerged light increases swimming depth and reduces fish density of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in production cages. *Aquac. Res.* 34, 469–478.

K

Kærn, M., Elston, T.C., Blake, W.J., and Collins, J.J. (2005). Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat. Rev. Genet.* 6, 451–464.

Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C.A., and Hunter, C. (2004). A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Res.* 38, 3993–4001.

Kanis, E., Van den Belt, H., Groen, A.F., Schakel, J., and De Greef, K.H. (2004). Breeding for improved welfare in pigs: a conceptual framework and its use in practice. *Anim. Sci.-Glasg. THEN PENICUIK-* 78, 315–330.

Kestin, S.C., Knowles, T.G., Tinch, A.E., and Gregory, N.G. (1992). Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Vet. Rec.* 131, 190–194.

Kinkead, R., and Perry, S.F. (1991). The effects of catecholamines on ventilation in rainbow trout during hypoxia or hypercapnia. *Respir. Physiol.* 84, 77–92.

Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nat. Rev. Genet.* 5, 826–837.

Kitano, H. (2007). Towards a theory of biological robustness. *Mol. Syst. Biol.* 3, n/a – n/a.

Knap, P.W. (2005). Breeding robust pigs. *Aust. J. Exp. Agric.* 45, 763–773.

Knap, P.W. (2009). Robustness. *Resour. Alloc. Theory Appl. Farm Anim. Prod.* 288.

Knowles, T.G., Kestin, S.C., Haslam, S.M., Brown, S.N., Green, L.E., Butterworth, A., Pope, S.J., Pfeiffer, D., and Nicol, C.J. (2008). Leg Disorders in Broiler Chickens: Prevalence, Risk Factors and Prevention. *PLoS ONE* 3, e1545.

Koakoski, G., Kreutz, L.C., Fagundes, M., Oliveira, T.A., Ferreira, D., Rosa, J.G.S. da, Barcellos, L.J.G., Koakoski, G., Kreutz, L.C., Fagundes, M., et al. (2013). Repeated stressors do not provoke habituation or accumulation of the stress response in the catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyol.* 11, 453–457.

Koltes, K.H. (1985). Effects of Sublethal Copper Concentrations on the Structure and Activity of Atlantic Silverside Schools. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114, 413–422.

- Komen, H., and Thorgaard, G.H. (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* 269, 150–173.
- Koolhaas, J., Korte, S., De Boer, S., Van Der Vegt, B., Van Reenen, C., Hopster, H., De Jong, I., Ruis, M.A., and Blokhuis, H. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 925–935.
- Koolhaas, J.M., de Boer, S.F., Buwalda, B., and van Reenen, K. (2007). Individual Variation in Coping with Stress: A Multidimensional Approach of Ultimate and Proximate Mechanisms. *Brain. Behav. Evol.* 70, 218–226.
- Korte, S.M., Koolhaas, J.M., Wingfield, J.C., and McEwen, B.S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 3–38.
- Korte, S.M., Olivier, B., and Koolhaas, J.M. (2007). A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiol. Behav.* 92, 422–428.
- Kramer, D.L. (1987). Dissolved oxygen and fish behavior. *Environ. Biol. Fishes* 18, 81–92.
- Kristiansen, T.S., Fernö, A., Holm, J.C., Privitera, L., Bakke, S., and Fosseidengen, J.E. (2004). Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture* 230, 137–151.

L

- Laursen, D.C., Silva, P.I.M., Larsen, B.K., and Höglund, E. (2013). High oxygen consumption rates and scale loss indicate elevated aggressive behaviour at low rearing density, while elevated brain serotonergic activity suggests chronic stress at high rearing densities in farmed rainbow trout. *Physiol. Behav.* 122, 147–154.
- Lawrence, A., Pollott, G.E., Gibbons, J., Haskell, M., Wall, E., Brotherstone, S., Coffey, M.P., White, I., and Simm, G. (2009). Robustness in dairy cows: experimental studies of reproduction, fertility, behaviour and welfare. *EAAP Publ. No126* 55–66.
- Le Bras, Y., Dechamp, N., Krieg, F., Filangi, O., Guyomard, R., Boussaha, M., Bovenhuis, H., Pottinger, T.G., Prunet, P., Roy, P.L., et al. (2011). Detection of QTL with effects on osmoregulation capacities in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genet.* 12, 46.
- Le Boucher, R., Quillet, E., Vandeputte, M., Lecalvez, J.M., Goardon, L., Chatain, B., Médale, F., and Dupont-Nivet, M. (2011). Plant-based diet in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): Are there genotype-diet interactions for main production traits when fish are fed marine vs. plant-based diets from the first meal? *Aquaculture* 321, 41–48.

- Le Boucher, R., Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Quillet, E., Ruelle, F., Vergnet, A., Kaushik, S., Allamellou, J.M., Médale, F., and Chatain, B. (2012). Genotype by diet interactions in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in case of a nutritional challenge on totally plant-based diets. *J. Anim. Sci.* *jas.2012*–5311.
- Lee, C.G., Farrell, A.P., Lotto, A., MacNutt, M.J., Hinch, S.G., and Healey, M.C. (2003). The effect of temperature on swimming performance and oxygen consumption in adult sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon stocks. *J. Exp. Biol.* *206*, 3239–3251.
- Leroi, A.M. (2001). Molecular signals versus the Loi de Balancement. *Trends Ecol. Evol.* *16*, 24–29.
- Lesne, A. (2008). Robustness: confronting lessons from physics and biology. *Biol. Rev.* *83*, 509–532.
- Liebert, A.M., and Schreck, C.B. (2006). Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *Gen. Comp. Endocrinol.* *148*, 195–202.
- Liew, H.J., Chiarella, D., Pelle, A., Faggio, C., Blust, R., and De Boeck, G. (2013). Cortisol emphasizes the metabolic strategies employed by common carp, *Cyprinus carpio* at different feeding and swimming regimes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *166*, 449–464.
- Lima, S.L., and Dill, L.M. (1990). Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can. J. Zool.* *68*, 619–640.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., and Meaney, M.J. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science* *277*, 1659–1662.

M

- MacIntyre, C.M., Ellis, T., North, B.P., and Turnbull, J.F. (2008). The Influences of Water Quality on the Welfare of Farmed Rainbow Trout: A Review. In *Fish Welfare*, E.J. Branson, ed. (Blackwell Publishing Ltd), pp. 150–184.
- Maina, J. (2002). Structure, function and evolution of the gas exchangers: comparative perspectives. *J. Anat.* *201*, 281–304.
- Malapert, M., Guizouarn, H., Fievet, B., Jahns, R., Garcia-Romeu, F., Motais, R., and Borgese, F. (1997). Regulation of Na⁺/H⁺ antiporter in trout red blood cells. *J. Exp. Biol.* *200*, 353–360.
- Marques, S.P.C., and Creus, G.J. (2012). *Computational Viscoelasticity* (Springer Science & Business Media).

- Martins, C.I.M., Ochola, D., Ende, S.S.W., Eding, E.H., and Verreth, J.A.J. (2009). Is growth retardation present in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in low water exchange recirculating aquaculture systems? *Aquaculture* 298, 43–50.
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., and Verreth, J.A.J. (2011). Stressing fish in Recirculating Aquaculture Systems (RAS): does stress induced in one group of fish affect the feeding motivation of other fish sharing the same RAS? *Aquac. Res.* 42, 1378–1384.
- Martins, C.I.M., Galhardo, L., Noble, C., Damsgård, B., Spedicato, M.T., Zupa, W., Beauchaud, M., Kulczykowska, E., Massabuau, J.-C., Carter, T., et al. (2012). Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 17–41.
- McDonald, G., and Milligan, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. *Fish Stress Health Aquac.* 62, 119–145.
- McKenzie, D. (2011). Energetics of fish swimming. In *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, (Academic Press), pp. 1636–1644.
- McKenzie, D., Taylor, E., Valle, A.D., and Steffensen, J. (2002). Tolerance of acute hypercapnic acidosis by the European eel (*Anguilla anguilla*). *J. Comp. Physiol. B* 172, 339–346.
- McKenzie, D.J., Piraccini, G., Steffensen, J.F., Bolis, C.L., Bronzi, P., and Taylor, E.W. (1995). Effects of diet on spontaneous locomotor activity and oxygen consumption in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Fish Physiol. Biochem.* 14, 341–355.
- McKenzie, D.J., Höglund, E., Dupont-Prinet, A., Larsen, B.K., Skov, P.V., Pedersen, P.B., and Jokumsen, A. (2012). Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. *Aquaculture* 338–341, 216–222.
- McNamara, J.M., and Buchanan, K.L. (2005). Stress, resource allocation, and mortality. *Behav. Ecol.* 16, 1008–1017.
- Mellor, D.J., Cook, C.J., and Stafford, K.J. (2000). Quantifying some responses to pain as a stressor. *Biol. Anim. Stress Basic Princ. Implic. Welf.* 171–198.
- Michel, V., Peinnequin, A., Alonso, A., Buguet, A., Cespuglio, R., and Canini, F. (2007). Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis impairment. *Neuroscience* 147, 522–531.
- Moore, A.J., Brodie, E.D., and Wolf, J.B. (1997). Interacting Phenotypes and the Evolutionary Process: I. Direct and Indirect Genetic Effects of Social Interactions. *Evolution* 51, 1352.
- Morgan, J.D., and Iwama, G.K. (1991). Effects of Salinity on Growth, Metabolism, and Ion Regulation in Juvenile Rainbow and Steelhead Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Fall Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 2083–2094.
- Morgan, J.D., and Iwama, G.K. (1996). Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 385–394.

Mousseau, T.A., and Roff, D.A. (1987). Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* 59, 181–197.

Mumby, P.J., Chollett, I., Bozec, Y.-M., and Wolff, N.H. (2014). Ecological resilience, robustness and vulnerability: how do these concepts benefit ecosystem management? *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 7, 22–27.

N

Nakamura, F. (1986). Avoidance behavior and swimming activity of fish to detect pH changes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 808–815.

Napel, J. ten, Bianchi, F., and Bestman, M. (2006). Utilising intrinsic robustness in agricultural production systems: Inventions for a sustainable development of agriculture. (TransForum Agro & Groen),.

Napel, J. ten, Calus, M.P.L., Mulder, H.A., Veerkamp, R.F., Klopčič, M., Reents, R., Philipsson, J., and Kuipers, A. (2009). Genetic concepts to improve robustness of dairy cows. *Breed. Robustness Cattle* 35–44.

Nielsen, H.M., Olesen, I., Navrud, S., Kolstad, K., and Amer, P. (2011). How to Consider the Value of Farm Animals in Breeding Goals. A Review of Current Status and Future Challenges. *J. Agric. Environ. Ethics* 24, 309–330.

Nikinmaa, M. (1992). Membrane transport and control of hemoglobin-oxygen affinity in nucleated erythrocytes. *Physiol. Rev.* 72, 301–321.

Nilsson, J.-Å. (2003). Ectoparasitism in marsh tits: costs and functional explanations. *Behav. Ecol.* 14, 175–181.

Norman, J.D., Danzmann, R.G., Glebe, B., and Ferguson, M.M. (2011). The genetic basis of salinity tolerance traits in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *BMC Genet.* 12, 81.

O

Olla, B.L., and Studholme, A.L. (1971). The Effect of Temperature on the Activity of Bluefish, *Pomatomus Saltatrix* L. *Biol. Bull.* 141, 337–349.

Oppedal, F., Juell, J.E., and Johansson, D. (2007). Thermo- and photoregulatory swimming behaviour of caged Atlantic salmon: Implications for photoperiod management and fish welfare. *Aquaculture* 265, 70–81.

Øverli, Ø., Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Øverli, E., and Winberg, S. (2002). Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. *J. Exp. Biol.* 205, 391–395.

- Øverli, Ø., Korzan, W.J., Höglund, E., Winberg, S., Bollig, H., Watt, M., Forster, G.L., Barton, B.A., Øverli, E., Renner, K.J., et al. (2004). Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. *Horm. Behav.* 45, 235–241.
- Øverli, Ø., Winberg, S., and Pottinger, T.G. (2005). Behavioral and Neuroendocrine Correlates of Selection for Stress Responsiveness in Rainbow Trout—a Review. *Integr. Comp. Biol.* 45, 463–474.

P

- Pankhurst, N.W. (2011). The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 265–275.
- Pankhurst, N.W., Kraak, G. van der, Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., and Schreck, C.B. (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. 73–93.
- Parker, A.J., Hamlin, G.P., Coleman, C.J., and Fitzpatrick, L.A. (2003). Dehydration in stressed ruminants may be the result of cortisol-induced diuresis. *J. Anim. Sci.* 81, 512–519.
- Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R.C., Arganda, S., and de Polavieja, G.G. (2014). idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nat. Methods* 11, 743–748.
- Perry, S.F., and Abdallah, S. (2012). Mechanisms and consequences of carbon dioxide sensing in fish. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 309–315.
- Perry, S.F., and Gilmour, K.M. (2002). Sensing and transfer of respiratory gases at the fish gill. *J. Exp. Zool.* 293, 249–263.
- Petochi, T., Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M.G., Mercatali, I., and Marino, G. (2011). Coping strategy and stress response of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to acute and chronic environmental hypercapnia under hyperoxic conditions. *Aquaculture* 315, 312–320.
- Pickering, A.D. (1992). Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 100, 125–139.
- Pickering, A.D., and Pottinger, T.G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 253–258.
- Pigliucci, M. (2001). *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture* (JHU Press).
- Pike, T.W., Samanta, M., Lindstrom, J., and Royle, N.J. (2008). Behavioural phenotype affects social interactions in an animal network. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 2515–2520.

- Postlethwaite, E., and McDonald, D. (1995). Mechanisms of Na⁺ and C⁻ regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. *J. Exp. Biol.* 198, 295–304.
- Pottinger, T.G., and Carrick, T.R. (1999). Modification of the Plasma Cortisol Response to Stress in Rainbow Trout by Selective Breeding. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116, 122–132.
- Pottinger, T.G., and Carrick, T.R. (2001). Stress Responsiveness Affects Dominant–Subordinate Relationships in Rainbow Trout. *Horm. Behav.* 40, 419–427.
- Pottinger, T.G., and Mosuwe, E. (1994). The Corticosteroidogenic Response of Brown and Rainbow Trout Alevins and Fry to Environmental Stress during a “Critical Period.” *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 350–362.
- Powell, K. (2003). Fish farming: Eat your veg. *Nature* 426, 378–379.

Q

- Queitsch, C., Carlson, K.D., and Girirajan, S. (2012). Lessons from Model Organisms: Phenotypic Robustness and Missing Heritability in Complex Disease. *PLoS Genet* 8, e1003041.
- Quillet, E., Garcia, P., and Guyomard, R. (1991). Analysis of the production of all homozygous lines of rainbow trout by gynogenesis. *J. Exp. Zool.* 257, 367–374.
- Quillet, E., Dorson, M., Le Guillou, S., Benmansour, A., and Boudinot, P. (2007). Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 510–519.
- Quillet, E., Krieg, F., Dechamp, N., Hervet, C., Bérard, A., Le Roy, P., Guyomard, R., Prunet, P., and Pottinger, T.G. (2014). Quantitative trait loci for magnitude of the plasma cortisol response to confinement in rainbow trout. *Anim. Genet.* n/a – n/a.

R

- Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M.L., and Schreck, C.B. (2006). Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 258, 565–574.
- Randall, D.J., and Lin, H. (1993). Effects of Variations in Water pH on Fish. In *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*, B. Lahlou, and P. Vitiello, eds. (American Geophysical Union), pp. 31–45.
- Rauw, W.M. (2007). Physiological consequences of selection for increased performance. <http://www.aaabg.org/livestocklibrary/2007/rauww240.pdf>.

- Rauw, W.M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E.N., and Grommers, F.J. (1998). Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest. Prod. Sci.* 56, 15–33.
- Rea, S.L., Wu, D., Cypser, J.R., Vaupel, J.W., and Johnson, T.E. (2005). A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 37, 894–898.
- Reid, S.G., Bernier, N.J., and Perry, S.F. (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 120, 1–27.
- Reynolds, C. (1987). Flocks, herds and schools: A distributed behavioral model. (ACM), pp. 25–34.
- Romero, L.M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19, 249–255.
- Romero, L.M., Dickens, M.J., and Cyr, N.E. (2009). The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm. Behav.* 55, 375–389.
- Ros, M., Sorensen, D., Waagepetersen, R., Dupont-Nivet, M., SanCristobal, M., Bonnet, J.-C., and Mallard, J. (2004). Evidence for Genetic Control of Adult Weight Plasticity in the Snail *Helix aspersa*. *Genetics* 168, 2089–2097.
- Rosny, J.D., and Roux, P. (2001). Multiple scattering in a reflecting cavity: Application to fish counting in a tank. *J. Acoust. Soc. Am.* 109, 2587–2597.
- Ross, R.M., Krise, W.F., Redell, L.A., and Bennett, R.M. (2001). Effects of dissolved carbon dioxide on the physiology and behavior of fish in artificial streams. *Environ. Toxicol.* 16, 84–95.
- Ruane, N.M., Wendelaar Bonga, S.E., and Balm, P.H.M. (1999). Differences between Rainbow Trout and Brown Trout in the Regulation of the Pituitary–Interrenal Axis and Physiological Performance during Confinement. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 210–219.
- Ruane, N.M., Huisman, E.A., and Komen, J. (2001). Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. *J. Fish Biol.* 59, 1–12.

S

- Sadoul, B., Evouna Mengues, P., Friggens, N.C., Prunet, P., and Colson, V. (2014a). A new method for measuring group behaviours of fish shoals from recorded videos taken in near aquaculture conditions. *Aquaculture* 430, 179–187.

- Sadoul, B., Leguen, I., Colson, V., Friggens, N.C., and Prunet, P. (2014b). A multivariate analysis using physiology and behavior to characterize robustness in two isogenic lines of rainbow trout exposed to a confinement stress.
- Sandoe, P., Nielsen, B.L., Christensen, L.G., and Sorensen, P. (1999). Staying good while playing god--the ethics of breeding farm animals. *Anim. Welf. South Mimms Engl.* 8, 313–328.
- Santos, G.A., Schrama, J.W., Capelle, J., Rombout, J.H.W.M., and Verreth, J. a J. (2013). Effects of dissolved carbon dioxide on energy metabolism and stress responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquac. Res.* 44, 1370–1382.
- Sauvant, D., and Martin, O. (2010). Robustesse, rusticité, flexibilité, plasticité... les nouveaux critères de qualité des animaux et des systèmes d'élevage: définition systémique et biologique des différents concepts. *Prod. Anim.* 23, 5–9.
- Scherer, E. (1992). Behavioural responses as indicators of environmental alterations: approaches, results, developments. *J. Appl. Ichthyol.* 8, 122–131.
- Schjolden, J., Backström, T., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., and Winberg, S. (2005). Divergence in behavioural responses to stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with contrasting stress responsiveness. *Horm. Behav.* 48, 537–544.
- Schjolden, J., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., Metcalfe, N.B., and Winberg, S. (2006). Divergence in locomotor activity between two strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with contrasting stress responsiveness. *J. Fish Biol.* 68, 920–924.
- Schluter, D., Price, T.D., and Rowe, L. (1991). Conflicting Selection Pressures and Life History Trade-Offs. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 246, 11–17.
- Schreck, C.B., Olla, B.L., and Davis, M.W. (1997). Behavioral responses to stress. In *Fish Stress and Health in Aquaculture*,.
- Schuring, E., Quadts, F., Kovacs, E.M.R., Meullenet, J.-F., Wiseman, S., and Mela, D.J. (2012). A quantitative method for estimating and comparing the duration of human satiety responses: Statistical modeling and application to liquid meal replacers. *Appetite* 59, 601–609.
- Scott, A.P., and Ellis, T. (2007). Measurement of fish steroids in water - a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 392–400.
- Scott, G.R., and Sloman, K.A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.
- Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 117–230.
- Selye, H. (1976). *The stress of life* (McGraw-Hill).

- Sluyter, F., Korte, S.M., Bohus, B., and Van Oortmerssen, G.A. (1996). Behavioral stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 113–116.
- Smit, B., and Wandel, J. (2006). Adaptation, adaptive capacity and vulnerability. *Glob. Environ. Change* 16, 282–292.
- Spruijt, B.M., van den Bos, R., and Pijlman, F.T.A. (2001). A concept of welfare based on reward evaluating mechanisms in the brain: anticipatory behaviour as an indicator for the state of reward systems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 72, 145–171.
- Staddon, J.E. (2001). *Adaptive dynamics: The theoretical analysis of behavior* (MIT press).
- Star, L., Ellen, E.D., Uitdehaag, K., and Brom, F.W.A. (2008). A plea to implement robustness into a breeding goal: poultry as an example. *J. Agric. Environ. Ethics* 21, 109–125.
- Steffensen, J.F. (1989). Some errors in respirometry of aquatic breathers: How to avoid and correct for them. *Fish Physiol. Biochem.* 6, 49–59.
- Steffensen, J.F., Tufts, B.L., and Randall, D.J. (1987). Effect of burst swimming and adrenaline infusion on O₂ consumption and CO₂ excretion in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.* 131, 427–434.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., and de Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow*.
- Stien, L.H., Bratland, S., Austevoll, I., Oppedal, F., and Kristiansen, T.S. (2007). A video analysis procedure for assessing vertical fish distribution in aquaculture tanks. *Aquac. Eng.* 37, 115–124.
- Storset, A., Strand, C., Wetten, M., Kjølglum, S., and Ramstad, A. (2007). Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 272, *Supplement 1*, S62–S68.
- Strandberg, E., Klopčič, M., Reents, R., Philipsson, J., and Kuipers, A. (2009). The role of environmental sensitivity and plasticity in breeding for robustness: lessons from evolutionary genetics. *Breed. Robustness Cattle M Klopčič R Reents J Philipsson Kuipers Ed EAAP Sci. Ser.* 17–33.
- Summerfelt, S.T., and Sharrer, M.J. (2004). Design implication of carbon dioxide production within biofilters contained in recirculating salmonid culture systems. *Aquac. Eng.* 32, 171–182.
- Summerfelt, S.T., Vinci, B.J., and Piedrahita, R.H. (2000). Oxygenation and carbon dioxide control in water reuse systems. *Aquac. Eng.* 22, 87–108.
- Szuran, T., Zimmerman, E., Pliska, V., Pfister, H.P., and Welzl, H. (1991). Prenatal stress effects on exploratory activity and stress-induced analgesia in rats. *Dev. Psychobiol.* 24, 361–372.

T

- Takase, M., Murata, M., Hibi, K., Huifeng, R., and Endo, H. (2014). Development of mediator-type biosensor to wirelessly monitor whole cholesterol concentration in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 40, 385–394.
- Tedeschi, L.O. (2006). Assessment of the adequacy of mathematical models. *Agric. Syst.* 89, 225–247.
- Thomas, J.B., and Gilmour, K.M. (2012). Low social status impairs hypoxia tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. B* 182, 651–662.
- Thomas, S., Fievet, B., Barthelemy, L., and Peyraud, C. (1983). Comparison of the effects of exogenous and endogenous hypercapnia on ventilation and oxygen uptake in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *J. Comp. Physiol.* 151, 185–190.
- Thornton, P.K. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 2853–2867.
- Thurston, R.V., Phillips, G.R., Russo, R.C., and Hinkins, S.M. (1981). Increased Toxicity of Ammonia to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Resulting from Reduced Concentrations of Dissolved Oxygen. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 983–988.
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1366–1375.
- Toutain, P.L., and Bousquet-Mélou, A. (2004). Plasma clearance. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 415–425.
- Trenzado, C.E., Carrick, T.R., and Pottinger, T.G. (2003). Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 332–340.
- Tzaneva, V., Gilmour, K.M., and Perry, S.F. (2011). Respiratory responses to hypoxia or hypercapnia in goldfish (*Carassius auratus*) experiencing gill remodelling. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 175, 112–120.

V

- Van der Most, P.J., de Jong, B., Parmentier, H.K., and Verhulst, S. (2011). Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. *Funct. Ecol.* 25, 74–80.
- Van Raaij, M.T.M., Pit, D.S.S., Balm, P.H.M., Steffens, A.B., and van den Thillart, G.E.E.J.M. (1996). Behavioral Strategy and the Physiological Stress Response in Rainbow Trout Exposed to Severe Hypoxia. *Horm. Behav.* 30, 85–92.

- Via, S., Gomulkiewicz, R., De Jong, G., Scheiner, S.M., Schlichting, C.D., and Van Tienderen, P.H. (1995). Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends Ecol. Evol.* 10, 212–217.
- Viscido, S.V., Parrish, J.K., and Grnbaum, D. (2004). Individual behavior and emergent properties of fish schools: a comparison of observation and theory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 273, 239–249.
- Von Borell, E.H. (2001). The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J. Anim. Sci.* 79, E260–E267.
- Vrijenhoek, R.C. (1994). Unisexual Fish: Model Systems for Studying Ecology and Evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 71–96.

W

- Wedemeyer (1997). *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*.
- Weis, P., and Weis, J.S. (1974a). DDT causes changes in activity and schooling behavior in goldfish. *Environ. Res.* 7, 68–74.
- Weis, P., and Weis, J.S. (1974b). Schooling behavior of *Menidia menidia* in the presence of the insecticide Sevin (Carbaryl). *Mar. Biol.* 28, 261–263.
- Welker, T.L., McNulty, S.T., and Klesius, P.H. (2007). Effect of Sublethal Hypoxia on the Immune Response and Susceptibility of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, to Enteric Septicemia. *J. World Aquac. Soc.* 38, 12–23.
- Wilkie, M.P., and Wood, C.M. (1996). The adaptations of fish to extremely alkaline environments. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 113, 665–673.
- Wilson, J. (1998). beta-Naphthoflavone abolishes interrenal sensitivity to ACTH stimulation in rainbow trout. *J. Endocrinol.* 157, 63–70.
- Wilson, G.S., and Gifford, R. (2005). Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2388–2403.
- Wingfield, J.C. (2013). The comparative biology of environmental stress: behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments. *Anim. Behav.* 85, 1127–1133.
- Woodward, C.C., and Strange, R.J. (1987). Physiological Stress Responses in Wild and Hatchery-Reared Rainbow Trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116, 574–579.
- Wu, H., Aoki, A., Arimoto, T., Nakano, T., Ohnuki, H., Murata, M., Ren, H., and Endo, H. Fish stress become visible: A new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress. *Biosens. Bioelectron.*

X

- Xu, J., Liu, Y., Cui, S., and Miao, X. (2006). Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. *Aquac. Eng.* 35, 207–217.

Z

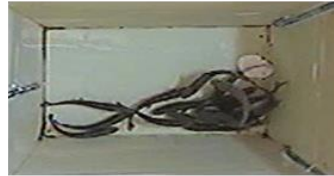
- Zambonino-Infante, J.L., Claireaux, G., Ernande, B., Jolivet, A., Quazuguel, P., Sévère, A., Huelvan, C., and Mazurais, D. (2013). Hypoxia tolerance of common sole juveniles depends on dietary regime and temperature at the larval stage: evidence for environmental conditioning. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20123022.

Annexes de l'article 1

Case study 1



Case study 2

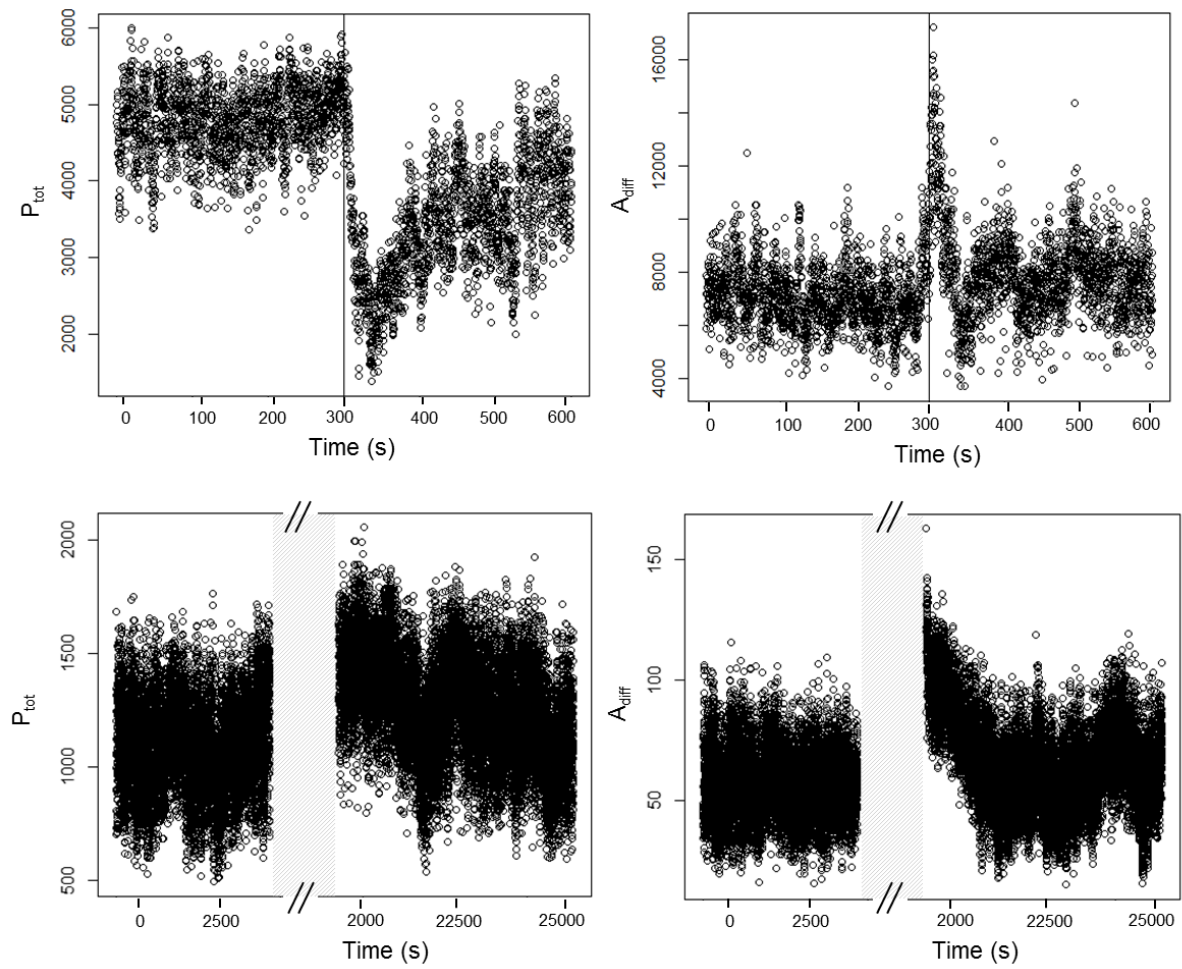


Appendix 1. 2 images taken from video records in each case study

Appendix 2. Results output from models comparing true values and indexes (P_{tot} , SDX, SDY and A_{diff}) in two different swimming simulations of a fish shoal in a tank.

In simulation 1, shoal cohesion was gradually increased and decreased. In simulation 2, fish speed was gradually increased and decreased.

	Model	Coefficient	Estimate	Std. Error	P-value	R2
Simulation 1 Distance to CG	Distance to CG = $\mu + \alpha * P_{tot} + \epsilon$	μ	1047	8,9	<0,001	0,96
		α	0,67	0,004	<0,001	
	Distance to CG = $\mu + \alpha * SDX + \epsilon$	μ	1792	12,24	<0,001	0,82
		α	21,76	0,2545	<0,001	
	Distance to CG = $\mu + \alpha * SDY + \epsilon$	μ	1778	12,86	<0,001	0,81
		α	35,04	0,4289	<0,001	
Simulation 2 Swimming speed	Swimming speed = $\mu + \alpha * A_{diff} + \epsilon$	μ	-12	0,28	<0,001	0,94
		α	0,6217	0,0042	<0,001	



Appendix 3. Illustration of group behavioral indexes for one aquarium in each case study.

ABSTRACT

The ability of an organism to respond to an environmental perturbation is a growing scientific concern in animal ecology and animal production sciences. Depending on animal vulnerability, these environmental perturbations can affect health, welfare, or fitness of the animal. Robustness, defined as the ability to resist to environmental change, are therefore important components of production sustainability or biodiversity. Our work aimed at better estimating and characterizing the robustness in rainbow trout by describing the degree of perturbation when facing an acute perturbation. Adaptive responses to environmental perturbations are diversified and numerous, but they can be described by temporal patterns giving indications on the resistance, the recovery ability or the environmental sensitivity of the animal. The integration of these features provides an estimation of the degree of perturbation of the animal facing the environmental change.

Physiological and behavioral responses of two isogenic lines (within each line, all individuals have the same genome) of rainbow trout were followed before, during and after an acute challenge. The effects of a confinement or a hypercapnia challenge were investigated. Temporal patterns were analyzed in order to characterize within and between line variabilities in reactivity to the challenge and recovery capacities.

All measures were impacted by the challenges, indicating that both lines triggered adaptive responses. The cortisol release rate was the only measure showing significant mean differences between the two lines in both studies. Multivariate analyses highlighted two independent coping strategies consisting in either favoring behavior or physiology modification. The results showed also a strong and unexpected within line variability, suggesting the importance of life history on the degree of perturbation. At last, the between-study comparison showed an inversion in physiological reactivity between the two lines, suggesting that robustness is challenge-specific or robustness implies challenge-specific reactivities.

This study sets also the basis for a model able to precisely and explicitly characterize the degree of perturbation of a perturbed system. The model was validated on the data analyzed in this project but should be sufficiently generic to cope with data from other species.

Keywords: robustness, stress, behavior, physiology, trout, *Oncorhynchus mykiss*, modeling

RESUME

La capacité des animaux à faire face à des perturbations environnementales est une préoccupation croissante en écologie et en production. En fonction de la vulnérabilité des animaux, les modifications environnementales peuvent impacter leur santé, leur bien-être ou leur capacité de reproduction. La robustesse, définie comme la capacité à conserver ses fonctions malgré les perturbations environnementales est donc une composante importante de la durabilité d'une production ou de la biodiversité. Le travail présenté ici vise à apporter des éléments de réponses quant à la robustesse chez la truite arc-en-ciel, en décrivant le degré de perturbation face à une perturbation aiguë. Le degré de perturbation de l'animal est décrit en intégrant les différentes réponses adaptatives de l'animal face à une perturbation donnée.

Des réponses adaptatives physiologiques et comportementales ont été suivies chez deux lignées isogéniques (au sein de chaque lignée tous les individus présentent le même génome) de truite arc-en-ciel avant, pendant et après une perturbation aiguë. Les effets de challenges aigus de confinement ou d'hypercapnie ont été étudiés. Les cinétiques de réponses ont été analysées afin de faire ressortir la variabilité intra- et inter-lignée de réactivité au challenge et de capacité à récupérer du challenge.

Chez les deux lignées, toutes les mesures effectuées montrent un effet de la perturbation indiquant la mise en place de mécanismes adaptatifs. La mesure de cortisol dans l'eau s'est avérée être la seule mesure montrant des différences moyennes inter-lignées de réponses face au challenge. Parallèlement, les analyses multivariées ont souligné la présence de deux stratégies d'adaptation indépendantes, consistant à modifier son comportement ou sa physiologie. Nous avons également observé une forte et inattendue variabilité intra-lignée, illustrant l'importance de l'histoire de vie sur le degré de perturbation de la truite arc-en-ciel. Finalement, la comparaison entre les deux expériences montre une inversion de réactivité physiologique entre les deux lignées isogéniques suggérant que la robustesse est challenge-spécifique ou que la robustesse nécessite des réactivités challenge-spécifiques.

Ce travail pose également les bases d'un modèle capable de caractériser de façon précise et explicite les degrés de perturbation à partir de cinétiques de réponses adaptatives face à une perturbation aiguë. Le modèle a été validé sur des données de truite arc-en-ciel mais devrait être suffisamment générique pour s'adapter aux réponses d'autres espèces.

Mots-clés: robustesse, stress, comportement, physiologie, truite, *Oncorhynchus mykiss*, modélisation.